

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Biologia cellulare, molecolare e industriale
Progetto n. 3: “Microbiologia e biotecnologie industriali”

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 03/D1
Settore Scientifico - Disciplinare: CHIM/10

**NUOVI INGREDIENTI FUNZIONALI PER
L'APPLICAZIONE IN CAMPO ALIMENTARE**

Presentata da: Barbara Bonsi

Coordinatore Dottorato

Alejandro Hochkoeppler

Relatore

Leonardo Setti

Esame finale anno 2012

SOMMARIO

1	INTRODUZIONE	3
1.1	La Dieta Mediterranea	3
1.2	I polifenoli	6
1.3	Polifenoli da sottoprodotti dell'industria agro-alimentare	8
1.3.1	Polifenoli da crusca	10
1.3.2	Polifenoli da acque di vegetazione d'oliva	13
1.3.3	Polifenoli da vinacce di uva rossa	16
1.4	Biocatalizzatori industriali per l'idrolisi dei tessuti vegetali	18
1.5	Idrolizzati di crusca, di acque di vegetazione delle olive e di vinacce	19
1.6	Alimenti funzionali e fortificati	21
2	SCOPO	23
3	PARTE SPERIMENTALE	27
3.1	Caratterizzazione bio-liquefatti acquosi	27
3.2	Pane con idrolizzato di crusca di grano	27
3.2.1.1	Prove aerobiche e anaerobiche	31
3.2.1.2	Prove di fermentazione a diversa concentrazione di idrolizzato di crusca con e senza zucchero	33
3.2.1.3	Fermentazione dell'idrolizzato di crusca a diversa concentrazione in assenza zucchero	35
3.2.1.4	Determinazione acido ferulico durante le prove di fermentazione	37
3.3	Pane con mix di idrolizzato d'uva e oliva	45
3.3.1	Valutazione sperimentale del mix d'uva e oliva: sinergia di effetto antiossidante	46
3.3.2	Test in uso del mix di idrolizzato d'oliva e uva	47
3.3.3	Mix in polvere nel pane	50
3.3.3.1	Controllo del mantenimento del potere antiossidante dopo liofilizzazione e panificazione	51
3.3.3.2	Pane con mix d'oliva e uva liofilizzato	51
3.4	Pasta all'uovo, formaggio e gelato con idrolizzato di oliva	52

3.4.1	Pasta all'uovo.....	53
3.4.2	Formaggio fresco e pecorino	54
3.4.3	Gelato.....	55
3.5	Estratti idro-enzimatici glicerici (e.i.e.)	55
3.5.1.1	Pasta di semola di grano duro con e.i.e. di tiglio e withania	56
3.5.1.2	Biscotti con e.i.e. di ribes, noce e propoli	59
3.5.1.3	Pane azzimo con e.i.e. di noce e astragalo	60
4	CONCLUSIONI	63
5	MATERIALI E METODI	65
5.1	Preparazione e trattamento pane.....	65
5.2	Determinazione della quantità di polifenoli totali con il metodo del Folin Ciocalteu.....	65
5.3	Determinazione del potere antiossidante totale (metodo del DPPH).....	66
5.4	Determinazione del contenuto di carboidrati totali (Metodo fenolo/solforico)	67
5.5	Determinazione degli zuccheri riducenti (Metodo dell'ADNS)	69
5.6	Determinazione dei pentosani (Metodo con fluoroglucinolo).....	71
5.7	Determinazione del contenuto in acido ferulico tramite HPLC.....	72
5.8	Preparazione campione di pasta all'uovo	74
5.8.1	Cottura, estrazione e analisi	74
5.9	Estratti idro-enzimatici (e.i.e.)	75
5.9.1	Preparazione estratti idro-enzimatici	75
5.9.2	Preparazione campione di pasta di semola di grano duro	75
5.9.2.1	Campioni di pasta secca e cotta	75
5.9.2.2	Prove di estrazione della pasta secca e cotta.....	75
5.9.2.3	Trattamento enzimatico della pasta cotta.....	76
5.9.3	Preparazione campione biscotti e pane azzimo	76
6	BIBLIOGRAFIA	77

1 INTRODUZIONE

1.1 La Dieta Mediterranea

La Dieta Mediterranea - intesa come “stile di vita”, cioè come insieme delle pratiche, delle rappresentazioni, delle espressioni, delle conoscenze, delle abilità, dei saperi e degli spazi culturali con i quali le popolazione del Mediterraneo hanno creato e ricreato nel corso dei secoli una sintesi tra l’ambiente culturale, l’organizzazione sociale, nel 2010 è stata iscritta dall’Unesco nella lista del patrimonio culturale immateriale dell’umanità.¹

La Dieta Mediterranea rappresenta un insieme di competenze, conoscenze, pratiche e tradizioni che vanno dal paesaggio alla tavola, includendo le colture, la raccolta, la pesca, la conservazione, la trasformazione, la preparazione e, in particolare, il consumo di cibo.



Figura 1-1: Piramide della Dieta Mediterranea con la distribuzione in frequenza e quantità di tutti gli alimenti

La Dieta Mediterranea è caratterizzata da un modello nutrizionale rimasto costante nel tempo e nello spazio, costituito principalmente da olio di oliva, cereali, frutta fresca e secca, verdure, una moderata quantità di pesce, latticini e carne, molti condimenti e spezie, il tutto accompagnato da vino o infusi, sempre in rispetto delle tradizioni di ogni comunità (Figura 1-1).

Un posto privilegiato nella dieta mediterranea è occupato dai cereali integrali, e dai suoi derivati. Questa classe è generalmente rappresentata da pane, pasta e riso, ma anche da altri cereali spesso poco considerati quali mais, orzo, farro, avena...

Immediatamente sopra ai cereali si trovano frutta, verdura e legumi. Indubbi sono i vantaggi apportati da frutta e verdura, quali senso di sazietà, a fronte di un ridotto potere calorico, apporto di acqua, vitamina C. Non bisogna dimenticare anche l'importanza dei legumi in quanto ricchi di carboidrati a lento assorbimento (basso indice glicemico), sali minerali, vitamine e fibra alimentare, ma soprattutto, se comparati con altri cibi vegetali, ricchi di proteine che, insieme a quelle fornite dai cereali, forniscono all'organismo tutto lo spettro amminoacidico necessario.

La Dieta Mediterranea si basa poi su un consumo di pesce e carne. Il consumo di pesce è maggiormente consigliato soprattutto grazie alle ottime quantità proteiche che fornisce, alla presenza di acidi grassi essenziali e di alcuni sali minerali. Per quanto riguarda la carne si tende a preferire quella bianca (ricca in proteine, vitamine e sali minerali) a quella rossa.

Infine, molto importanti soprattutto per l'apporto di proteine, sono le uova e i latticini.

Attualmente questa dieta viene raccomandata perché:

- assicura un apporto adeguato di nutrienti;
- è basata su cibi naturali, poco elaborati;
- riduce il rischio per numerose malattie quali ad esempio quelle cardiovascolari (poiché tale dieta apporta pochi grassi saturi, che aumentano i livelli di colesterolo LDL, è ricca di fibre alimentari che riducono l'assorbimento intestinale dei lipidi, di acido oleico che abbassa il colesterolo LDL senza influenzare quello HDL e fornisce acidi grassi omega-3 che hanno spiccate proprietà antitrombotiche);
- riduce il rischio di sviluppare il diabete di tipo II poiché è ricca di fibre alimentari che rallentano la velocità di assorbimento intestinale degli zuccheri, prevenendo così i picchi glicemici.²

Entrando nello specifico in alcuni settori di questa dieta, per quanto riguarda pane, pasta, patate, farro, orzo, cereali, etc., essi sono indispensabili in un'alimentazione equilibrata in quanto sono fonte dei principali carboidrati semplici (glucosio,

fruttosio, saccarosio, maltosio, lattosio,...) e complessi (amido e fibra alimentare) che, insieme a proteine, lipidi e alcool servono a soddisfare i fabbisogni energetici dell'organismo per lo svolgimento dei processi biologici che hanno luogo nelle cellule.³

La fibra alimentare, pur non potendosi considerare un nutriente, esercita effetti di tipo funzionale e metabolico molto determinante che la fanno così ritenere una importante componente della dieta umana. La fibra alimentare è per definizione resistente alla digestione e all'assorbimento nel tratto superiore dell'intestino umano ma può andare incontro a fermentazione ad opera della microflora residente nel colon, per questo, oltre all'aumento del senso di sazietà, al miglioramento della funzionalità intestinale e dei disturbi ad essa associati (stipsi, diverticolosi), si è visto che l'assunzione di fibra con gli alimenti può portare ad una riduzione del rischio di malattie cronico - degenerative, in particolare dei tumori al colon-retto, del diabete e delle malattie cardiovascolari^{4,5}.

Un altro elemento determinante nella Dieta Mediterranea è l'olio d'oliva, composto da una frazione saponificabile (trigliceridi) e da una frazione in saponificabile (sostanze anti-ossidanti quali i fenoli e altri componenti minori quali steroli, idrocarburi e alcoli terpenici). Esso costituisce una buona fonte alimentare di acidi grassi essenziali e ha diverse proprietà benefiche soprattutto per quanto riguarda i livelli di colesterolo, la pressione sanguigna e, essendo ricco di fenoli previene l'arteriosclerosi e rallenta l'invecchiamento cellulare.⁶

Infine, una particolare attenzione va rivolta al vino che pur nella necessità di un suo moderato consumo (è consigliata un'assunzione del vino pari a un bicchiere scarso a pasto), è un elemento importante, per i suoi contenuti, da utilizzare nel ruolo che la nutrizione ha assunto negli ultimi decenni nella prevenzione dei problemi sanitari e nella riduzione del rischio di malattie croniche. Il vino infatti è un prodotto complesso, contenente numerosi composti, molti dei quali vantano particolari funzioni fisiologiche, talora anche in sinergismo con altri.

Di particolar interesse, oltre ai vari studi sulla diminuzione del rischio di malattie cardio-coronariche con l'assunzione moderata di alcol ^(7, 8, 9), è il ruolo protettivo che possono svolgere alcuni costituenti non alcolici del vino, quali i composti fenolici. Numerose sostanze fenoliche (flavonoidi e non, flavonoli, antociani e

tannini solubili, ecc.) presenti nel vino rosso ¹⁰ (oltre che nella frutta e nella verdura ¹¹) possono svolgere un ruolo protettivo nei confronti di varie malattie cronico - degenerative (dall'arteriosclerosi a vari tipi di tumore, fino all'accelerazione dei processi di senescenza¹²) facilitate dai radicali liberi dell'ossigeno. Molto recentemente è stato dimostrato, sia in vitro sia in vivo, che l'assunzione di vino rosso (più ricco in fenoli rispetto a quello bianco) aumenta l'attività antiossidante del siero del sangue ¹³ e inibisce l'ossidazione delle LDL e attenua la tendenza alla trombosi ¹⁴.

Visti i molteplici effetti benefici che si possono ricavare dai fenoli presenti in vari alimenti tipici della Dieta Mediterranea, ma non potendo abusare nel consumo di alcuni di essi come per esempio olio d'oliva e vino o preferendo a volte un tipo di alimento non integrale a uno integrale ricco di fibre, si può oggi procedere all'estrazione dei fenoli di interesse da varie matrici di partenza vegetali o addirittura da scarti di lavorazione agro-industriale e introdurli poi successivamente in una molteplice gamma di prodotti alimentari finiti, permettendo così l'assunzione dei vari fenoli, con conseguenti benefici per la salute, in modo semplice e quotidiano.

1.2 I polifenoli

I polifenoli, insieme ad altre centinaia di molecole importanti si trovano naturalmente nelle piante, in quanto esse, a differenza degli animali, non possono sfuggire, scappare da minacce esterne, assumere sostanze chimiche curative oltre a quelle che sono in grado naturalmente di sintetizzare e quindi, l'unico modo possibile che hanno per proteggersi da fattori esterni dannosi, come per esempio radiazione UV, inquinamento, aggressioni patogene, è quello di sintetizzare tutte le centinaia di molecole necessarie alla loro sopravvivenza. Il mix di molecole contenute nelle piante ha una complessa composizione che massimizza l'effetto protettivo delle singole molecole grazie ad attività sinergiche e integrate.

Questo mix di molecole, in particolar modo i biofenoli (specifici fito-composti con attività antiossidante), adeguatamente estratti dalle piante, ma anche ricavati dagli scarti di lavorazione dell'industria agro-alimentare, hanno recentemente riscosso un grande interesse nel mercato come prodotti antiossidanti che possono

essere impiegati in vari settori industriali che si occupano di plastica e di elastomeri, di lubrificanti, di oli e di additivi per i combustibili e di alimentare. Particolare interesse è legato alla loro applicazione nel mercato dei prodotti per la salute dell'uomo sia come nutraceutici che come cosmeceutici.

I composti fenolici rappresentano una delle principali classi di metaboliti secondari dei vegetali, che comprende un ampio spettro di sostanze molto eterogenee, ma tutte caratterizzate dalla presenza di un anello aromatico con uno o più sostituenti ossidrilici. La loro estesa presenza nel regno vegetale è indispensabile per la pianta in quanto svolge un'azione protettiva contro l'irraggiamento UV, gli attacchi di patogeni e di erbivori. L'attività antiossidante dei fenoli risiede nella capacità di essere facilmente ossidati, in condizioni blande, sia dai comuni ossidanti presenti in natura, come i radicali liberi, l'ossigeno e i perossidi, sia dalle radiazioni ultraviolette. L'attività antibatterica e antifungina dei fenoli è dovuta all'azione sinergica del potere antiossidante e del potere chelante dei gruppi ossidrilici dell'anello fenolico che formano i legami ad idrogeno con le proteine della parete cellulare dei microrganismi¹⁵.

I composti fenolici si caratterizzano per una grande diversità della loro struttura chimica. Tali composti compaiono in una forma libera oppure legati ai composti come saccaridi e acidi organici: sono stati identificati oltre 800 agliconi e circa 4000 sono presenti sotto forma di glicosidi, esteri e altre combinazioni¹⁶.

Nel regno vegetale i fenoli sono variamente distribuiti e possono essere idrosolubili, liposolubili oppure legati covalentemente a vari costituenti della parete cellulare. Gli esteri solubili hanno generalmente funzioni antiossidanti e antimicrobiche, mentre i fenoli liposolubili e quelli legati alla parete cellulare svolgono prevalentemente una funzione strutturale di *cross-linking* delle catene polisaccaridiche che la costituiscono. I composti solubili sono generalmente costituiti da gruppi fenolici funzionalizzati con zuccheri o acidi organici. Esempi di questi composti sono gli acidi idrossicinnamici del glucosio, della colina, dell'acido chinico, malonico e tartarico, gli esteri gallici dell'epicatechina e gli esteri p-cumarici degli antociani.

I composti fenolici insolubili si originano principalmente dall'instaurarsi di legami covalenti di tipo estere tra composti fenolici, prevalentemente idrossicinnamati e loro derivati, e composti costituenti la parete cellulare.

I composti fenolici lipofilici sono generalmente costituiti da idrossicinnamati legati a steroli, alcoli terpenici o triterpeni e sono comunemente associati alla membrana cellulare¹⁷.

In base alla struttura dell'anello benzoico, i composti polifenolici possono essere suddivisi in tre sottogruppi:

- C6-C1 acidi fenolici, derivanti dall'acido benzoico, come ad esempio i protocatecuici e l'acido gallico;
- C6-C3 acidi propenolici; derivanti dall'acido cinnamico come l'acido ferulico e l'acido caffeico;
- C6.C3-C6 flavonoidi di cui fanno parte ad esempio malvidina, quercitina e la classe degli antociani.

I più importanti gruppi di polifenoli che incidono sulle proprietà "sensoriali" del cibo sono gli antociani, responsabili del colore rosso di molta frutta e specie di fiori e gli acidi fenolici catechine e i proantociani che, come i precursori dei tannini, sono responsabili del colore, gusto astringente e odore di molti prodotti alimentari.

I flavonoidi, invece, sono i più conosciuti grazie alla loro funzione di protezione contro le malattie cardiovascolari, principalmente a causa della loro attività stabilizzante sulle pareti dei vasi capillari.

Non si riscontra nessun effetto tossico dovuto ai polifenoli ricavati dai vegetali presenti nella alimentazione umana, anche se il loro ruolo nel metabolismo dell'organismo umano è tuttora oggetto di studi approfonditi¹⁸.

1.3 Polifenoli da sottoprodotti dell'industria agro-alimentare

I derivanti fenolici, in conseguenza della loro diffusione nel regno vegetale, si ritrovano naturalmente anche nella composizione dei prodotti di scarto, sia liquidi che solidi, di numerosi impianti di lavorazione agro-alimentare.

I fenoli, quindi, oltre che venire direttamente estratti dalle piante, possono venire estratti anche dagli scarti dell'industria agro-alimentare andando così a valorizzare

questi scarti e riducendo così problema un grosso problema ambientale dato dallo smaltimento di questi scarti e riducendo il fabbisogno di risorse naturali grazie all'allungamento del ciclo di vita del prodotto e sviluppando allo stesso tempo un nuovo mercato, più sostenibile.

L'industria agro-alimentare ed i suoi prodotti generano un'elevata quantità di scarti, in massima parte non pericolosi, solitamente avviati ad operazioni di recupero ai sensi dell'art. 7 del D.lgs.22/97.

In Europa la produzione di scarti agro-alimentari viene stimata intorno ai 250 milioni di ton/anno e in Italia la maggior parte di questi rifiuti sono sottoprodotti dell'industria di lavorazione dei cereali (11 milioni di ton/anno), della vite (2,3 milioni di ton/anno) e delle olive (1,2 milioni di ton/anno)¹⁹.

Per quanto riguarda i residui derivanti dalla lavorazione dei cereali, il 40-60% viene utilizzato come lettiera per animali e per la produzione della carta in vari comparti²⁰, invece degli scarti di lavorazione enologici e olivicoli viene riutilizzato solo il 25%.

Il problema della gestione e dello smaltimento di tali scarti ha una notevole ricaduta sulla comunità in termini di costi e di inquinamento dell'ambiente, tanto che negli ultimi anni le aziende operanti nei paesi industrializzati hanno rivolto un'attenzione sempre maggiore alla valutazione di impatto ambientale e alla produzione di prodotti di qualità.

La valorizzazione di tali materie di scarto, attraverso varie tecnologie di recupero (biotecnologie bianche per la produzione di biomateriali naturali, processi catalitici eco-compatibili per la conversione di biomasse in combustibili e prodotti ad alto valore aggiunto, digestione anaerobica/aerobica per la produzione di biocombustibili da biomasse di diversa origine,...²¹), possono generare una vasta gamma di composti organici ad alto valore aggiunto, utilizzabili in tutti i settori risolvendo quindi un problema ambientale e riducendo il fabbisogno di risorse naturali grazie all'allungamento del ciclo di vita del prodotto e sviluppando allo stesso tempo un nuovo mercato.

Questa valorizzazione integrata degli scarti, presenta però una debole sostenibilità economica, legata sostanzialmente ad un difetto di domanda di mercato delle frazioni chimiche ad alto valore aggiunto ottenibili applicando trattamenti fisici,

biochimici e cromatografici per la liberazione, la separazione ed il recupero delle componenti fitochimiche. La domanda di componenti fitochimiche purificate nel settore cosmetico o alimentare sono interessanti ma decisamente scarse rispetto alla potenziale offerta derivante dagli scarti che implicano volumi enormi. Questo eccesso di offerta, se venisse esercitata, causerebbe un rapido abbassamento del valore aggiunto sul lato della domanda. Risulta così evidente la necessità di implementare la domanda aprendo l'accesso al mercato degli ingredienti funzionali che, nel settore alimentare, sarebbero in grado di assorbire il potenziale dell'offerta.

1.3.1 Polifenoli da crusca

I cereali rappresentano la base dell'alimentazione mondiale e le loro coltivazioni sono tra le maggiori nel mondo. Si stima infatti che circa i due terzi della superficie coltivabile sulla terra siano dedicati alla loro produzione. A livello italiano i cereali (mais, grano duro e tenero, sorgo e orzo) costituiscono una produzione di circa 21 milioni di tonnellate.

La lavorazione di tali cereali porta alla produzione di scarti fino ad una quantità di 11 milioni di tonnellate all'anno²².

I prodotti derivanti della trasformazione dei cereali rappresentano da sempre gli alimenti di base per l'uomo essendo un'ottima fonte energetica ed una ricca risorsa di vitamine e sali minerali. I cereali possono essere inoltre trasformati in un'ampia gamma di prodotti, soddisfacendo le abitudini e le tradizioni alimentari più diverse.

Nelle popolazioni mediterranee il pane è l'alimento di base; in Italia viene consumato dal 96% della popolazione, mentre in Francia la percentuale si abbassa all'85% a favore però di altri prodotti da forno²³.

Attualmente i consumatori cercano un buon pane nel quale l'apporto energetico sia unito ai fattori nutrizionali tipici del pane tradizionale, sia esso integrale che arricchito per via naturale con i componenti tipici della crusca, utili per favorire un maggiore benessere.

E' noto che l'uso di farine a basso tasso di abburattamento, con l'eliminazione pressoché completa della crusca, porta ad un impoverimento di sali minerali (fino al 80%), oligoelementi (fino al 90%), vitamine (fino al 60%), diminuendo il

valore nutrizionale del prodotto finale. E' sempre più evidente che quello che tradizionalmente veniva considerato uno scarto ha in realtà importanti proprietà nutrizionali che possono risultare interessanti al fine di una valorizzazione di tale prodotto.

La crusca (Figura 1-2) è costituita dalle parti tegumentali del chicco, dove si ritrovano cellule con una grossa parete cellulare. La cellulosa, tra i principali costituenti della parete cellulare delle cellule tegumentali, è un polimero costituito da solo glucosio, ma le singole unità sono interessate in un legame diverso da quello tipico dell'amido e, perciò, non idrolizzabile da parte dei sistemi amilolitici. Questa macromolecola è completamente insolubile in acqua e assicura rigidità alla parete cellulare. Essa rappresenta una frazione importante di quella che viene comunemente chiamata fibra alimentare, di cui è stato largamente illustrato l'effetto positivo sulla peristalsi intestinale.

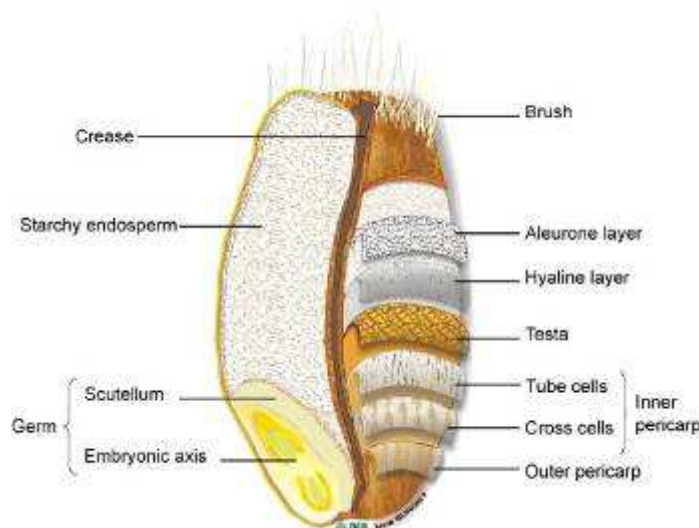


Figura 1-2: Struttura della crusca

Un altro interessante componente delle pareti cellulari è rappresentato dalla frazione dei pentosani, polimeri assai complessi formati da zuccheri diversi dal glucosio (pentosi) che vanno a costituire parte della fibra non cellulosica presente nei sottoprodotti dell'industria del cereale (25-40% sul secco)²⁴ ai quali è stato riconosciuto, negli ultimi anni, un ruolo attivo nella formazione dell'impasto, dovuto all'elevata capacità di legare acqua.

Un altro gruppo di composti molto importanti presenti nella crusca sono i polifenoli. Questi vengono localizzati in prevalenza sulle pareti cellulari degli

strati esterni. Una minima parte è rappresentata da lignina²⁵, mentre più frequenti sono i fenoli semplici. Alcuni di questi, come i dimeri dell'acido ferulico, influenzano le caratteristiche meccaniche delle pareti e, di conseguenza, anche il comportamento durante la macinazione.

L'acido ferulico (Figura 1-3) è un fenolo della classe degli acidi idrossicinnamici ed è il principale costituente della frazione fenolica delle crusche. E' presente in elevate quantità nelle crusche di frumento e di mais dove può rappresentare sino al 4 % del peso secco della matrice vegetale²⁶.

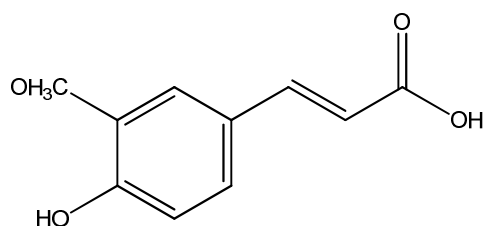


Figura 1-3: Acido ferulico

Tabella 1-1: Composizione della crusca in termini di carboidrati, lignina e acidi cinnamici

Monosaccaridi	glucosio	41-44 % (20% cellulosa, 80% amido)
	xilosio	13-17 %
	arabinosio	3-4 %
	galattosio	2-3 %
Lignina		3-4 %
Acidi cinnamici	acido ferulico	0,4-0,5 %
	acido <i>p</i> -cumarico	0,014 %

Diversi studi hanno recentemente dimostrato gli effetti positivi sulla salute umana dell'acido ferulico, così come di molti altri biofenoli.

Oltre ad un elevato potere antiossidante legato alle caratteristiche di scavenging di questa molecola nei confronti dei radicali liberi, evidenziata anche in sistemi biologici²⁷, l'acido ferulico ha mostrato attività inibitorie nei confronti di diverse specie microbiche²⁸ tra cui diversi ceppi di *Listeria monocytogenes*, un batterio patogeno capace di crescere su derrate alimentari ed un'ottima capacità di filtro nei confronti dell'irraggiamento UV²⁹ sulla cute. Ampiamente studiati sono gli effetti antinfiammatori³⁰, di protezione del sistema cardiocircolatorio^{31,32} e di difesa delle cellule neuronali³³.

1.3.2 Polifenoli da acque di vegetazione d'oliva

L'olivo è una pianta conosciuta fin dall'antichità. La coltivazione dell'olivo ha sempre avuto una notevole importanza economica e sociale nei paesi come la Spagna, l'Italia o la Grecia, dove si registra la maggior parte della produzione mondiale di olive (circa 98%)³⁴, stimata intorno ai 10 milioni di tonnellate.

In Italia, per la produzione dell'olio, vengono utilizzati circa 2.500.000 ton di olive. Purtroppo l'olio rappresenta appena il 15-20% della pasta oleosa, il resto è costituito da due sottoprodotti noti come sansa e acque reflue, meglio conosciute come acque di vegetazione.³⁵

La sansa, anche se con qualche difficoltà dovuta ad un alto livello di umidità, è stata impiegata nella produzione di compost e nella produzione di energia (per combustione o per pirolisi).

Per quanto riguarda le acque di vegetazione, queste sono caratterizzate da un elevato carico inquinante e da una conseguente difficoltà di smaltimento anche in ragione dei grandi volumi prodotti. In Italia si calcola una produzione di acque di vegetazione di circa 4 milioni di ton/anno, di cui solo 2 milioni nella sola regione Puglia.

Le acque di vegetazione derivano dall'acqua di costituzione della drupa e dall'acqua impiegata per la diluizione della pasta delle olive e per il lavaggio delle macchine.

Il problema del trattamento e smaltimento delle acque di vegetazione deriva dal loro elevato contenuto di sostanze organiche come zuccheri, pectine, grassi, sostanze azotate, polialcoli, poliacidi, fosforo, potassio e magnesio. Molte di queste molecole possiedono spiccate proprietà antimicrobiche e fitotossiche e conseguentemente risultano anche resistenti alla degradazione biologica, in particolare di tipo aerobico. La legislazione vigente (D.M. n. 574, 11/11/96)³⁶, permette lo spargimento sul terreno delle acque di vegetazione considerandolo un mezzo economico per smaltire un indesiderato sottoprodotto dell'industria olearia. Tale processo, seppur controllato e regolato da normative, non risolve il problema dello smaltimento, ma si limita a tentare di contenere le possibili ricadute negative, quali l'impoverimento dei suoli a lungo termine e la possibile contaminazione delle falde idriche del sottosuolo. Inoltre in questo modo si

abbandona una grande opportunità di recuperare una serie di composti molto attivi come i polifenoli, concentrati nelle acque di scarico³⁷.

Nonostante i benefici resi dall'olio d'oliva come elemento base della dieta mediterranea, le quantità di polifenoli presenti negli oli sono generalmente basse. Infatti circa il 99% della frazione polifenolica attiva, si ritrova nelle acque di vegetazione.

Negli ultimi anni sono stati molti i progetti per tentare di valorizzare questi scarti o renderli più facilmente smaltibili utilizzando sia processi di tipo fisico e chimico-fisico (processi di concentrazione dei reflui attraverso distillazione ed evaporazione, filtrazione su membrana, osmosi inversa, chiari-flocculazione e combustione) sia filiere di natura biologica (processi di depurazione sia aerobici, a fanghi attivi e a filtri percolatori, che anaerobici³⁸).

Il compostaggio delle acque di vegetazione è stato considerato solo recentemente come una pratica utile per umidificare la sostanza organica in essa contenuta. Si stanno sviluppando ricerche rivolte all'utilizzo degli scarti oleari come base di partenza per ottenere compost di qualità³⁹.

Nonostante questi trattamenti si siano dimostrati in grado di abbattere il potere inquinante delle acque di vegetazione e delle sanse, all'atto pratico sono difficilmente sostenibili dal punto di vista economico per la quasi totalità dei frantoi. D'altra parte, strutture così onerose, non possono essere concepite per impieghi su base stagionale, condizione inadeguata per la stessa efficienza degli impianti. Anche la possibilità di trattare con successo le acque di vegetazione mediante co-compostaggio, benché la qualità dei prodotti finali sia buona, e nonostante sia meno onerosa dal punto di vista impiantistico, risulta difficilmente attuabile visti i lunghi tempi necessari e, ancora una volta, il carattere stagionale della produzione.

Negli ultimi anni molti studi⁴⁰ di natura chimica hanno indicato che alcuni composti polifenolici presenti nelle acque di vegetazione, svolgono una serie di funzioni importanti, come per esempio la protezione dall'irraggiamento UV, l'attività antimicrobica nei confronti di una vasta gamma di batteri, ecc. Pertanto, sempre più spesso le acque di vegetazione vengono considerate non come un scarto di produzione, ma come un prodotto agricolo da valorizzare per essere poi

impiegato in settori diversi. Sono stati già utilizzati con successo nella produzione delle vernici ecologiche ad acqua, nell'agricoltura, inibendo la crescita di patogeni, ed anche nell'industria cosmetica, producendo cosmetici in grado di proteggere la pelle dai radicali liberi.

Le acque di vegetazione rappresentano un'importante fonte per l'estrazione di antiossidanti naturali come i fenoli tra i quali i più abbondanti sono l'oleuropeina, un derivato dell'idrossitirosolo, l'idrossitirosolo stesso, il tirosolo, e una grande varietà di antociani, catechine e altri composti, la cui composizione è fortemente influenzata dalla varietà di oliva e dalla stagionalità.

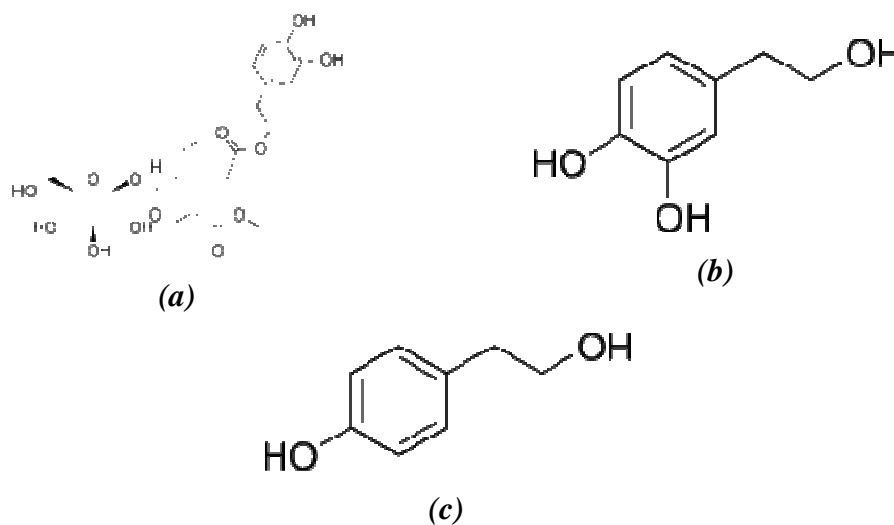


Figura 1-4: Oleuropeina (a), idrossitirosolo (b) e tirosolo (c)

Recentemente molti studi si sono concentrati soprattutto sull'idrossitirosolo una molecola polifenolica presente in maggior quantità nelle acque di vegetazione, ottenuta attraverso l'idrolisi di oleuropeina. L'idrossitirosolo deriva dall'idrolisi chimica o enzimatica del glucoside oleuropeina (principio amaro presente in notevole quantità sia nelle drupe che nelle foglie d'olivo) e, a causa della sua idrofilicità, è rilasciato principalmente nei reflui acquosi di frantoio e, in piccole quantità, nell'olio dove agisce come stabilizzante contro l'irrancidimento.

Sia l'idrossitirosolo che i suoi derivati, come per esempio il tirosolo, sono le molecole presenti in maggiori concentrazioni nell'olio extravergine d'oliva⁴¹ sia in forma libera che in forma esterificata, dove costituiscono il 70-80% del totale della frazione fenolica (Figura 1-5). Le concentrazioni d'idrossitirosolo e tirosolo, variano ampiamente in oli d'oliva differenti: da 1 a 40 ppm il primo e da 2 a 70

ppm il secondo, in base a vari fattori agronomici e tecnologici come la varietà del frutto e le procedure di estrazione⁴².

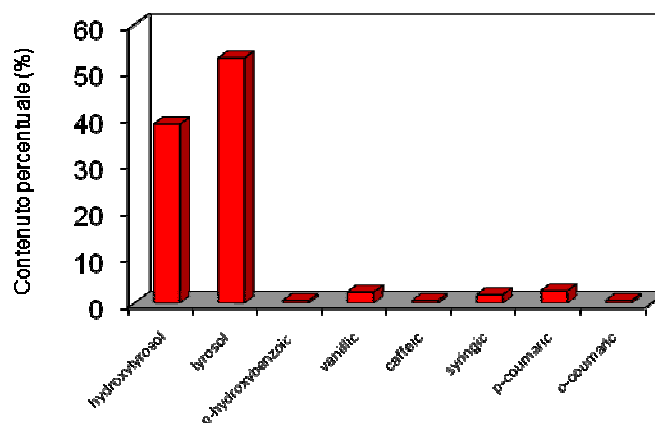


Figura 1-5: Distribuzione percentuale dei biofenoli nell'olio d'oliva⁴³

1.3.3 Polifenoli da vinacce di uva rossa

La produzione globale di vino risulta essere di circa 267 milioni di ettolitri, in dettaglio quella dell'Unione Europea è di 155 milioni di ettolitri mentre quella italiana costituisce il 20% di quella mondiale e il 33% di quella Europea⁴⁴ (Tabella 1-2) i cui costi all'ingrosso variano di anno in anno (Tabella 1-3).

Tabella 1-2: Scarti dell'industria vitivinicola a livello nazionale per l'anno 2004⁴⁵

Tipologia	Fattore di produzione (Kg scarto / hL vino)	Quantità (tonn)
Vinacce	18	925.000
Raspi	4	205.700
Solidi e fecce	6	308.600
Reflui della vendemmia	116	6.000.000
Fanghi	1	51.000

Tabella 1-3: Prezzi in €/tonn dei sottoprodotti vitivinicoli per l'annata 2002-2003 nella regione Emilia-Romagna⁴⁶

Sottoprodotti	Minimo	Massimo
Vinaccioli	8,78	13,94
Vinacce	25,82	103,29
Fecce	30,99	309,87

Nell'uva, e quindi nei suoi scarti, sono presenti sostanze polifenoliche per lo più localizzate nelle frazioni solide dell'uva. Poiché la formazione dei polifenoli è strettamente collegata alle condizioni climatiche, a seconda delle condizioni metereologiche, il contenuto di biofenoli nell'uva può variare sensibilmente.

Le sostanze polifenoliche delle uve possono essere suddivise in due classi⁴⁷: derivati del flavone e derivati dell'acido gallico o acido protocatechico (Figura 1-6).

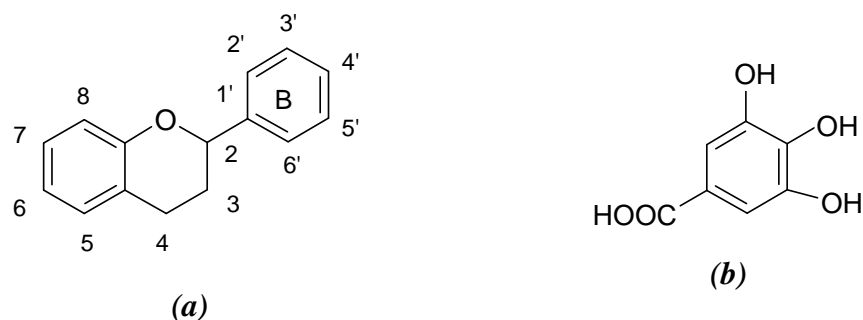


Figura 1-6: Nucleo di favone (a), acido gallico (b)

I polifenoli gallici sono generalmente costituiti da molecole glucosidiche (es. glucosio) esterificate con acido gallico o con i suoi derivati, ad esempio acido meta-digallico, e sono composti facilmente idrolizzabili per via chimica o enzimatica. Questi glucosidi possono venire idrolizzati dagli acidi a caldo o da enzimi dando origine ad una o più molecole di glucide ed alla molecola polifenolica libera che viene denominata “aglicone” (Figura 1-7) .

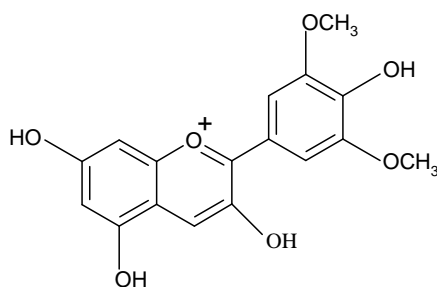


Figura 1-7: Aglicone della Malvina tipico antociano delle bucce d'uva

I polifenoli flavonoidici, invece, sono poli-idrossi derivati del flavone e si differenziano per il numero e la posizione dei gruppi ossidrilici presenti sul nucleo B, i più comuni sono il kaempferolo, la quercetina e la miricetina⁴⁸.

Nelle uve sono presenti anche derivati polimerizzati del flavano, prodotti di struttura assai complessa che prendono il nome di pro-antocianidine che sono costituite da unità di (+) –catechina e di (-)- epicatechina legate fra loro.

Altri composti polifenoli localizzati prevalentemente nella buccia, sono gli antociani, i coloranti rossi dell'uva. Si dividono in due gruppi, caratterizzati dall'avere o meno una molecola di glucosio legata al gruppo ossidrilico dell'anello centrale: antocianine (con molecola di glucosio) e antocianidine (senza molecola di glucosio).

Un'utilizzazione di notevole interesse per le vinacce rosse è l'estrazione del pigmento antocianico attraverso processi di estrazione che utilizzando anidride solforosa, macerazione e successiva defecazione e concentrazione sotto vuoto a bassa temperatura.

I tannini, presenti soprattutto nei raspi, nelle bucce (quelli ad alto peso molecolare) e nei vinaccioli (quelli a basso peso molecolare), sono antiossidanti e sono raggruppati in due classi: idrolizzabili (polifenoli gallici, tannini che hanno carattere di estere e possono essere idrolizzati per via acida ed enzimatica) e condensati (costituiti da due o più unità flavaniche - catechina, epicatechina, epigallocatechina ,gallo catechina - unite fra loro da legami C-C che non sono idrolizzabili). Nelle uve e nei vini sono presenti soprattutto i tannini condensati.

La maggior parte delle sostanze tanniche passano in soluzione nel mosto, nel corso della fermentazione in presenza delle vinacce (bucce ma soprattutto vinaccioli), per la maggior permeabilità delle cellule in ambiente asfittico e per azione solubilizzante dell'alcool favorita dall'aumento di temperatura che accompagna il fenomeno fermentativo. Di norma sono le uve più ricche in sostanze polifenoliche colorate quelle a maggior contenuto in tannini⁴⁹.

1.4 Biocatalizzatori industriali per l'idrolisi dei tessuti vegetali

Attualmente le tecniche di estrazione di polifenoli dalle matrici vegetale si basano principalmente sull'utilizzo di solventi organici o soluzione a forte carattere acido o basico. Questo avviene, ad esempio, nel caso dell'estrazione polifenolica dalle vinacce, dove vengono utilizzati i solventi organici come il metanolo o l'acetone o come nel caso della crusca, in cui i processi di idrolisi acida o basica, consentono

di ottenere il rilascio, in soluzione acquosa, delle sostanze fenoliche. Queste tecniche però presentano varie problematiche come l'utilizzo di sostanze pericolose, le alte concentrazioni di sali nei prodotti neutralizzati, dal punto di vista industriale risultano di difficile applicazione⁵⁰ e con esse si riescono a recuperare solo in parte le sostanze di interesse in quanto riescono a rompere solo alcuni legami chimici che le legano alla parete cellulare del vegetale.

Un'alternativa molto interessante nell'idrolisi delle strutture vegetali è l'applicazione dei biocatalizzatori enzimatici a specifiche attività idrolitiche.

I biocatalizzatori enzimatici sono sempre più largamente impiegati in molti settori dell'industria chimico-farmaceutica e delle trasformazioni agroalimentari grazie alla loro stereo-selettività, e al loro potenziale come efficienti catalizzatori alternativi per la chimica verde. I principali vantaggi tecnologici dell'impiego dei biocatalizzatori consistono nella possibilità di effettuare processi ad elevata efficienza in ambiente acquoso e in condizioni operative (pH, temperatura, pressione etc.) generalmente blande. Esistono ormai diversi prodotti commerciali utilizzati, per esempio nell'industria della panificazione, della produzione di succhi e conserve e in enologia, a base di enzimi idrolitici di diverso tipo. Molti microrganismi utilizzano infatti questi biocatalizzatori come strumenti per "aggredire" tessuti vegetali al fine di procurarsi i substrati di crescita di cui necessitano per il proprio sostentamento.

In questa prospettiva la continua sfida tra microrganismi e piante, tra sistemi di aggressione e di difesa, ha fatto sì che un amplissima gamma di enzimi sia stata selezionata dall'evoluzione ed oggi possa venire impiegata dall'uomo in specifici processi tecnologici.

1.5 Idrolizzati di crusca, di acque di vegetazione delle olive e di vinacce

I biofenoli comunemente presenti nella dieta umana, non sono sempre necessariamente e facilmente biodisponibili nell'organismo. La letteratura⁵¹ sostiene che anche una dieta relativamente ricca in fenoli possa apportare adeguate concentrazioni di tali molecole nel sangue e pare che ciò possa essere dovuto alla limitata capacità di assorbimento da parte dell'intestino. Inoltre è accertato che spesso i biofenoli vengono metabolizzati in fretta ed espulsi rapidamente. La gran

parte dei polifenoli presenti nei prodotti alimentari, si trova sotto forma di esteri, glicosidi, o polimeri che non sempre riescono ad essere assorbiti nella loro forma nativa.

In questo senso l'utilizzo di biocatalizzatori enzimatici con specifiche attività enzimatiche, in particolare carboidrasiche, può essere un valido aiuto nella preparazione di prodotti idrolizzati a partire da matrici di scarto come crusca ed acque di vegetazione delle olive, e ricchi in tutte quelle componenti chimiche ad alto valore nutrizionale altrimenti non assimilabili con la normale dieta. Per le diverse tipologie di vegetali è necessario conoscere le caratteristiche della parete cellulare vegetale da smantellare al fine di liberare i fenoli di interesse.

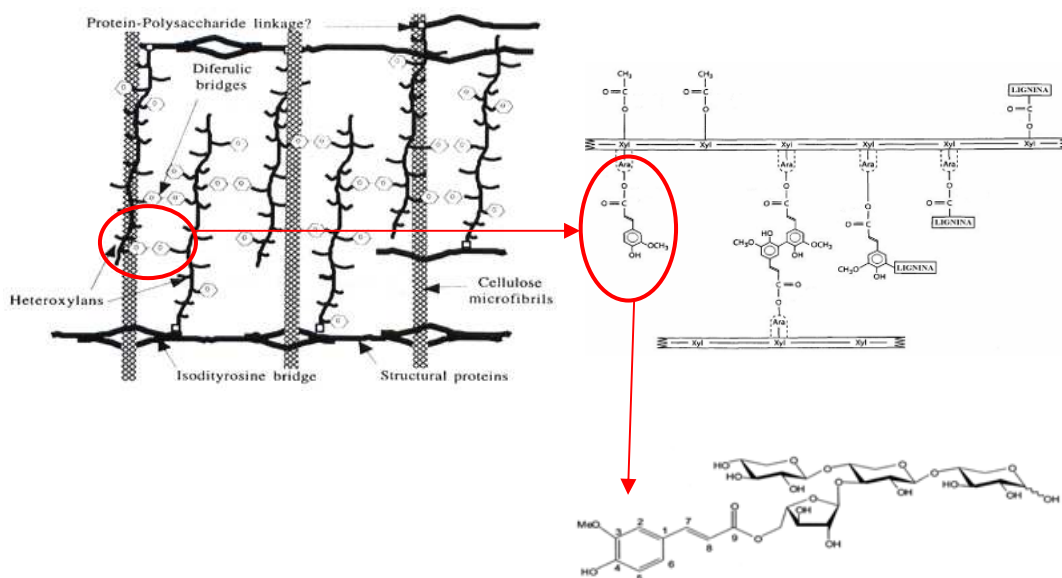


Figura 1-8: Rappresentazione di una parete cellulare vegetale secondaria con in evidenza porzioni arabinoxilatiche cross linkate da ponti diferulici e loro strutture

Ad esempio per la crusca ricca di acido ferulico, saranno necessarie maggiormente attività enzimatiche di tipo xilanasico, dal momento che tale componente si trova legato a strutture di xilano (Figura 1-8), mentre per una matrice come quella delle acque di vegetazione, l'idrossitiroso verrà liberato grazie all'utilizzo di attività pectinasiche.

Utilizzando inoltre enzimi di grado alimentare ad elevate attività carboidrasiche è possibile ottenere idrolizzati assolutamente sicuri per la salute umana in quanto durante il processo di lavorazione non viene usato nessun solvente o agente chimico aggressivo⁵², dal momento che l'idrolisi avviene in acqua.

1.6 Alimenti funzionali e fortificati

Tra gli scopi primari della dieta c'è quello di fornire nutrienti sufficienti a soddisfare le esigenze nutrizionali dell'individuo. Sono sempre di più le prove scientifiche a sostegno dell'ipotesi che alcuni alimenti e componenti alimentari abbiano effetti benefici, fisiologici e psicologici, che vanno oltre l'apporto dei nutrienti di base. La moderna scienza dell'alimentazione è andata oltre i concetti classici, consistenti nell'evitare carenze di nutrienti e nell'adequazione dell'alimentazione di base, passando al concetto di alimentazione "positiva" od "ottimale". La ricerca è oggi incentrata sull'identificazione dei componenti alimentari biologicamente attivi potenzialmente in grado di ottimizzare il benessere fisico e mentale e di ridurre anche il rischio di contrarre malattie. Si è scoperto che molti prodotti alimentari tradizionali, tipici della dieta mediterranea, come ad esempio frutta, verdura, cereali integrali e latte, contengono componenti potenzialmente benefici per la salute.

Oltre a questi però oggi, si stanno sviluppando nuovi alimenti che rafforzano o incorporano tali benefici grazie all'inserimento nei cibi di componenti utili per i loro effetti positivi sulla salute o per i favorevoli effetti fisiologici⁵³.

L'interesse nello sviluppo di cibi funzionali è prospero ed è spinto a gran forza dal potenziale mercato per i cibi destinati a migliorare la salute e il benessere dei consumatori. Un alimento può essere definito funzionale se, al di là delle proprietà nutrizionali, è scientificamente dimostrata la sua capacità di influire positivamente su una o più funzioni fisiologiche contribuendo a migliorare o preservare lo stato di salute e di benessere e/o ridurre il rischio di insorgenza delle malattie correlate al regime alimentare.⁵⁴

Diversi tipi di prodotti funzionali di ottima qualità progettati per ridurre l'alta pressione sanguigna, il colesterolo, lo zucchero nel sangue e l'osteoporosi sono stati introdotti nel mercato. La ricerca in questo senso si è progressivamente mossa verso lo sviluppo della integrazione dietetica, introducendo il concetto di probiotici e prebiotici, che possono incidere sulla composizione microbica dell'intestino e l'attività dello stomaco. Per esempio i cereali offrono molteplici effetti benefici e quindi possono essere sfruttati in differenti modi conducendo alla

concezione di nuovi cibi o di nuovi ingredienti da questi ottenuti per puntare al soddisfacimento alimentare di specifiche popolazioni.

È possibile anche accrescere maggiormente le proprietà benefiche dei cibi introducendo composti fenolici: l'industria alimentare si sta recentemente dirigendo anche verso l'inserimento dei polifenoli in preparati alimentari proprio come ulteriore valorizzazione dei prodotti alimentari stessi. Specialmente i biofenoli stanno attirando l'attenzione delle aziende che lavorano nel settore dei nutraceutici, vale a dire quelle sostanze che hanno sia carattere nutrizionale che farmaceutico.

Per le industrie alimentari e farmaceutiche, i nutraceutici, contenenti un'elevata quantità di antiossidanti, stanno riscuotendo un grande interesse come alimenti per la "tutela della salute". Le reazioni ossidative del metabolismo umano, infatti, generano una produzione di radicali liberi che deve essere controbilanciata da una serie di molecole definite antiossidanti. Su tale base, nei sistemi biologici, i biofenoli, poiché associati ad attività antiossidanti, costituiscono uno degli esempi più studiati. Precisamente, il ruolo di questo tipo di antiossidanti viene enfatizzato in relazione alla salute umana ed in particolare alla prevenzione ed alla cura di alcune forme tumorali⁵⁵.

Alla luce di queste ricerche, e delle più recenti tendenze del mercato mondiale degli additivi alimentari dotati di azioni protettive sulla salute, sulle peculiari proprietà dei biofenoli degli scarti agro-alimentari, nuovi prodotti contenenti tali molecole incontrerebbero il favore dei consumatori e di dell'industria nella produzione di cosiddetti alimenti fortificati ovvero prodotti alimentari tradizionali ai quali vengono aggiunte le molecole dalle proprietà protettive precedentemente descritte.

Attualmente nell'Unione Europea non vi è una legislazione specifica su questa categoria di alimenti e sulla sua etichettatura. Solo alcune nazioni estere possiedono una precisa legislazione sulla definizione, etichettatura e commercializzazione degli alimenti funzionali. In Giappone, per esempio tali alimenti sono riconosciuti e commercializzati con la sigla FOSHU (Food for Specific Health Use) e le proprietà funzionali sono comprovate da indagini scientifiche in vivo sulla popolazione.

2 SCOPO

Il lavoro di tesi, finanziato da Phenbiox s.r.l grazie al premio nazionale assegnato da UNIONCAMERE quale “Miglior Giovane Impresa Innovativa 2007”, è focalizzato allo studio e allo sviluppo di nuovi alimenti fortificati partendo da idrolizzati di matrici vegetali già presenti sul mercato come ad esempio i bio-liquefatti acquosi di crusca di grano, vinacce e acque di vegetazione preparati da Phenbiox s.r.l attraverso una tecnologia enzimatica brevettata⁵⁶.

Lo studio delle funzionalità si è basato principalmente sulla valutazione del mantenimento del potere antiossidante dei bio-liquefatti aggiunti anche dopo i vari processi di trasformazione per produrre i prodotti finali. Si è inoltre fatto un esame preliminare delle caratteristiche di accettabilità (visiva e sensoriale) dei vari prodotti ottenuti attraverso confronto con prodotti ottenuti allo stesso modo ma non contenenti ingredienti funzionali.

La scelta degli alimenti da funzionalizzare è stata fatta sulla base delle analisi di mercato, delle esigenze e richieste di Phenbiox e sulla possibilità di utilizzare estratti acquosi nella formulazione del prodotto alimentare finito.

Da un’analisi di mercato sulla distribuzione della spesa per grandi aggregati di prodotti (Figura 2-1) si è visto che, le voci di spesa maggiori dopo carne, salumi e uova sono quelle del latte e derivati dove si concentra il 18% della spesa (di cui l’11% riguarda i formaggi), dell’ortofrutta e dei derivati dei cereali con il 15%.

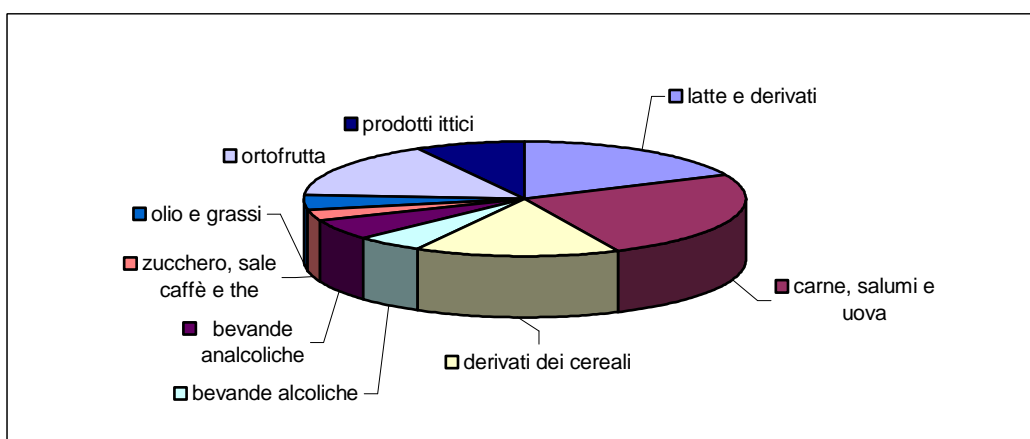


Figura 2-1: Distribuzione della spesa alimentare per grandi aggregati di prodotti (fonte: Ismea)

Andando ad analizzare più nel dettaglio il comparto dei derivati dei cereali e del latte e derivati, settori di maggior consumo e interesse nel campo della funzionalizzazione alimentare, si è visto che:

- per quanto riguarda la spesa per i derivati dei cereali (Figura 2-2), la fetta maggiore è ricoperta dalla panetteria (40%) seguita dai prodotti per la prima colazione e la pasta (con pasta di semola e fresca);

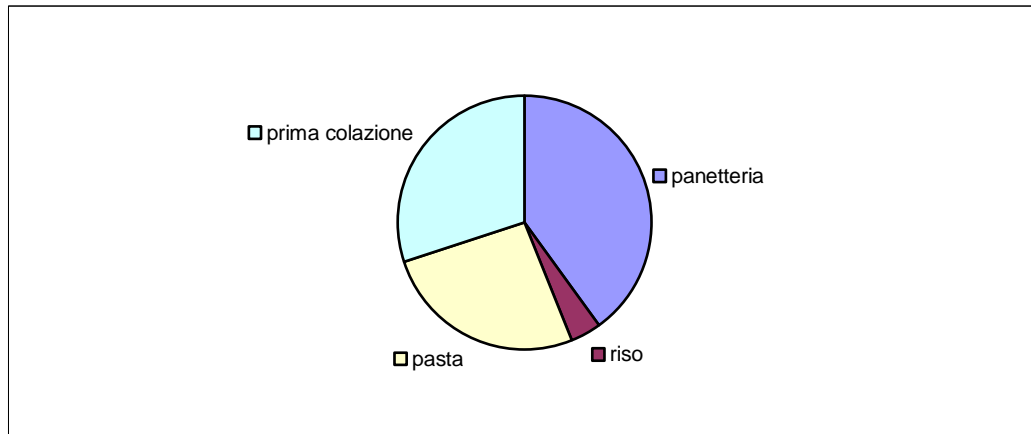


Figura 2-2: Composizione della spesa per derivati dei cereali (*fonte: Ismea*)

- per il comparto del latte e derivati (Figura 2-3) invece la spesa più importante è quella dei formaggi (61%).

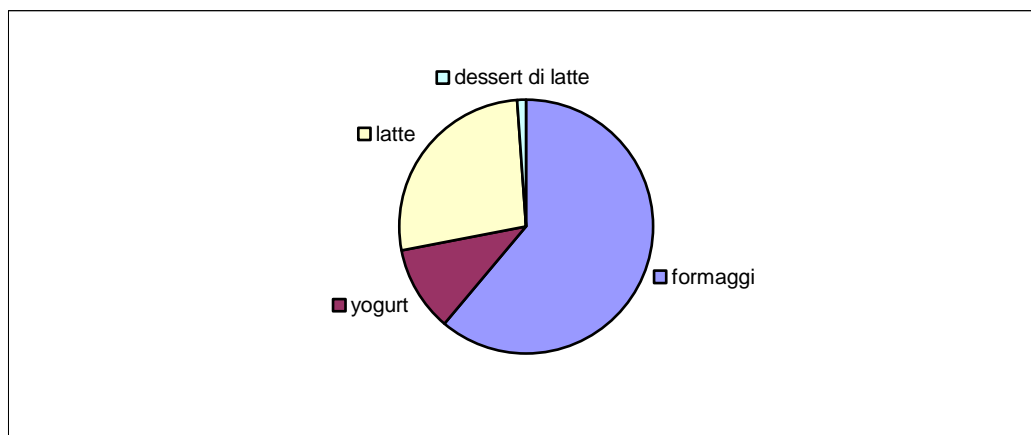


Figura 2-3: Composizione della spesa per latte e derivati (*fonte: Ismea*)

E' evidente che per veicolare i principi attivi che devono essere assunti regolarmente nella dieta, è necessario selezionare un veicolante diffusamente utilizzato giornalmente. Il pane e la pasta risultano quindi i veicolanti maggiormente presenti facendone così i principali obiettivi di questo lavoro di

tesi: da qui, l'interesse verso lo sviluppo di studi sulla fortificazione di prodotti da forno come il pane, la pasta e i biscotti.

In seguito si è passati ad un alimento facente parte della categoria latte e derivati cioè il formaggio, fresco e stagionato, ed in ultimo un alimento particolare ma sicuramente di grande diffusione e importanza in Italia quale il gelato.

Le matrici analizzate sono rappresentate da diverse qualità organolettiche e varie tipologie strutturali con un diversificato contenuto di acqua sia durante la preparazione dell'alimento che a prodotto finito. Per questa ragione il lavoro di tesi si è sviluppato secondo diverse strategie che potessero tener conto di queste differenziazioni. I principi attivi sono stati veicolati sia in solventi acquosi, per quegli alimenti che in fase preparatoria potevano sostenere quantità significative di acqua, che in polvere, nelle matrici in cui la quantità di acqua era limitata o si preferiva integrarle nella fase solida (Figura 2-4).



Figura 2-4: Utilizzo dei vari idrolizzati di crusca, oliva e uva in diverse matrici alimentari

E' stata anche studiata la possibilità di utilizzare estratti glicerici da piante officinali in quelle matrici in cui era necessario non apportare significativi volumi di acqua ma neppure di solido in polvere. A questo proposito alcuni estratti idroenzimatici, ottenuti da diverse piante di interesse dal punto di vista salutistico, sviluppati da Phenbiox per una linea erboristica (Adama), una volta aggiunti in vari prodotti da forno (Figura 2-5).

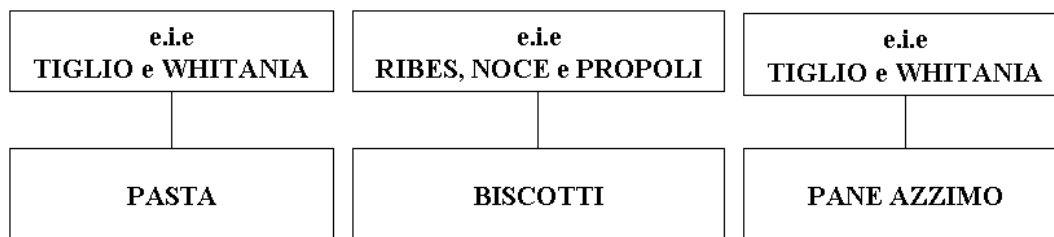


Figura 2-5: Funzionalizzazione di diversi prodotti da forno con gli estratti idro-enzimatici

3 PARTE SPERIMENTALE

3.1 Caratterizzazione bio-liquefatti acquosi

I 3 idrolizzati enzimatici usati sono prodotti da Phenbiox attraverso una tecnologia enzimatica brevettata di titolarità dell'Ateneo di Bologna e licenziata in esclusiva alla società⁵⁶ partendo da scarti industriali di crusca, acque di vegetazione e vinacce, sono stati caratterizzati attraverso analisi spettrofotometriche in termini di polifenoli totali (*metodo di Folin-Ciocalteu*), potere antiossidante (*metodo del DPPH*), carboidrati totali (*metodo fenolo/solforico*), zuccheri riducenti (*metodo dell'ADNS*) e pentosani (*metodo con floroglucinolo*).

I risultati riportati in Tabella 3-1 mostrano, come atteso, composizioni diverse per le tre diverse matrici in esame.

Tabella 3-1: Risultati analisi dei vari idrolizzati

	Bio-liquefatto di crusca di grano	Bio-liquefatto d'uva	Bio-liquefatto di oliva
<i>Polifenoli totali</i> (g/L)	0,20 ± 0,04	0,60 ± 0,01	1,2 ± 0,02
<i>Potere antiossidante</i> (ORAC/L)	950 ± 50	5700 ± 280	16000 ± 800
<i>Carboidrati totali</i> (mg/ml)	46 ± 4	9,4 ± 0,7	19 ± 1
<i>Zuccheri riducenti</i> (mg/ml)	22 ± 1	6,9 ± 0,3	13,5 ± 0,7
<i>Pentosani</i> (mg/ml)	15 ± 1	2,9 ± 0,2	4,0 ± 0,3

3.2 Pane con idrolizzato di crusca di grano

Nel mercato italiano sono già presenti diversi tipi di pane funzionale, quali per esempio il *Pancor* prodotto da Molino Vigevano, pane fresco che, grazie a una specifica miscela di fitosteroli è indicato per la riduzione del colesterolo⁵⁷ e il *Pane ai Cereali Alixir Cor* della Barilla che, grazie alla combinazione di principi attivi quali betaglucani, omega-3 e folati, garantisce un controllo dei livelli di colesterolo LDL e dei trigliceridi^{58,59,60}.

Visto quindi che attualmente i consumatori cercano un buon pane, nel quale l'apporto energetico sia unito ai fattori nutrizionali tipici del pane tradizionale, sia esso integrale che arricchito per via naturale con i componenti tipici della crusca,

utili a favorire un maggiore benessere, si è deciso come prima cosa di aggiungere ad un pane l'idrolizzato di crusca che permette di aggiungere all'alimento tutti i polifenoli presenti normalmente nella crusca ma in una forma più bio-disponibile e maggiormente assimilabile.

Per la preparazione dei pani utilizzati come matrici da funzionalizzare con l'idrolizzato di crusca, si è utilizzata una procedura suggerita dalla macchina per il pane utilizzata (paragrafo 5.1)

Un primo pane è stato preparato esattamente come da ricetta (*pane 100% acqua*) ed è stato successivamente usato come “bianco”. Gli altri pani sono stati invece funzionalizzati sostituendo parte dell'acqua o la sua totalità con l'idrolizzato di crusca. Si sono quindi preparati diversi pani rispettivamente con il 33,3 %, il 50 % e il 100 % di idrolizzato (Figura 3-1).



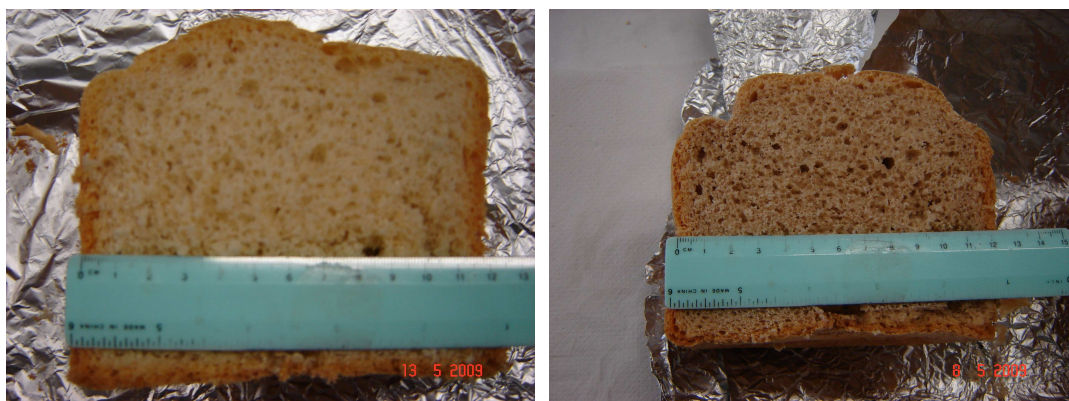
(a)



(b)



(c)



(d)

(e)

Figura 3-1: Pagnotta di pane prodotto con una comune macchina del pane (*a*) con diverse percentuali di idrolizzato di crusca di grano aggiunto: (*b*) 0%; (*c*) 33,3% (*d*) 50%, (*e*) 100%

Il pane funzionalizzato ottenuto presenta caratteristiche visive abbastanza simile in termini d'aspetto dell'impasto, mentre per la colorazione, si nota una colorazione un po' più tendente al marrone aumentando la percentuale di idrolizzato di crusca aggiunto, infatti la colorazione più tendente al marrone è bene evidente nel pane con il 100% di idrolizzato..

Per quanto riguarda le caratteristiche organolettiche, la presenza di idrolizzato non si percepisce se non leggermente nel pane col 100% di idrolizzato di crusca in sostituzione all'acqua.

Sui vari pani sono state svolte alcune delle analisi precedentemente svolte sugli idrolizzati (polifenoli totali e potere antiossidante, carboidrati totali e zuccheri riducenti e pentosani) per vedere come l'idrolizzato di crusca all'interno del pane si comportava a seguito del processo di panificazione in cui sono previste una fase di lievitazione e una di cottura che potrebbero andare a modificarlo.

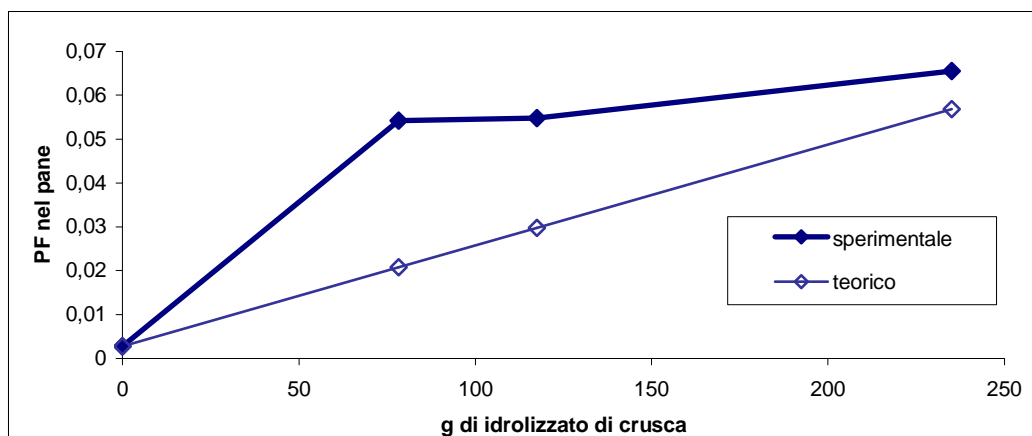


Figura 3-2: Determinazione dei polifenoli totali (PF) espressi in g per peso fresco di pane

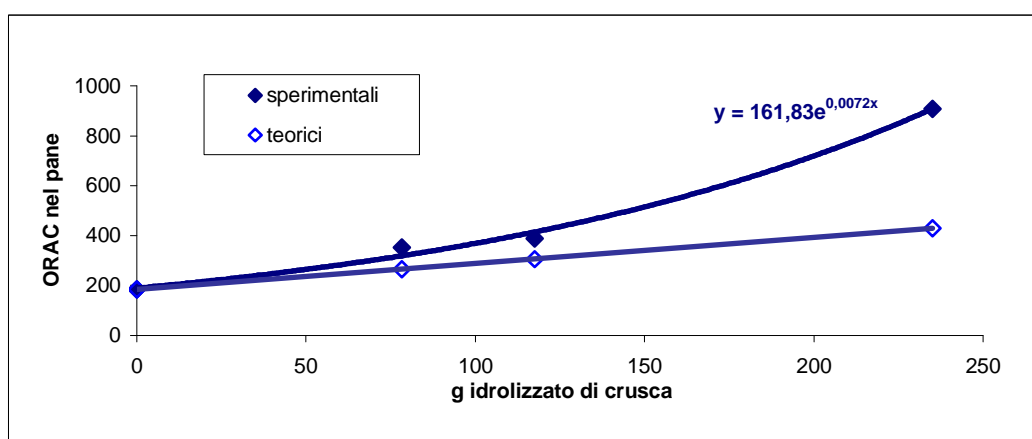


Figura 3-3: Determinazione del potere antiossidante espresso in ORAC per peso fresco di pane

Gli estratti dal campione di pane additivato di bioliquefatto hanno presentato una maggiore concentrazione di polifenoli totali rispetto a quelli teorici che si sarebbero dovuti recuperare per effetto dell'aggiunzione all'impasto (Figura 3-2). Tale incremento, tuttavia, non sembra proporzionale alla quantità di bioliquefatto aggiunto in quanto la concentrazione di polifenoli totali tende ad un valore costante per quantità di bio-liquefatto superiori a 60 g.

L'aumento dei polifenoli si riflette sui valori del potere antiossidante determinato in-vitro tramite l'indice di ORAC. Il potere antiossidante mostra valori ben al di sopra di quelli teoricamente calcolati e dovuti all'aggiunta della quota di potere antiossidante derivante dalla quantità di bio-liquefatto aggiunta (Figura 3-3). L'indice di ORAC nel pane additivato sembra incrementare in maniera esponenziale con l'aumento della quantità di bio-liquefatto aggiunto all'impasto (Figura 3-3). Questo andamento lascia ragionevolmente ipotizzare ad un effetto

sinergico tra il potere antiossidante del bio-liquefatto e la matrice del pane. L'aumento del potere antiossidante non deriva comunque da quello derivante da farina o lievito, infatti i valori di ORAC (misurati sperimentalmente) per questi ingredienti si possono considerare trascurabili.

La mancanza di potere antiossidante negli ingredienti ha fatto ipotizzare che l'incremento dell'ORAC potesse essere dovuto all'effetto del lievito sull'idrolizzato di crusca.

Tramite analisi in HPLC è stata poi determinata la concentrazione di acido ferulico nell'estratto rispetto a quella teorica derivante dall'aggiunta del bio-liquefatto nell'impasto. La quantità di acido ferulico recuperato è direttamente proporzionale alla quantità aggiunta nell'impasto, tuttavia risulta recuperato soltanto il 40% di quello effettivamente aggiunto (Figura 3-4).

Campione	Conc reale ACIDO FERULICO nel pane	Conc. teorica A. FERULICO nel pane	RECUPERO %
33,3% idrol.	0,0054	0,013	41
50% idrol.	0,0081	0,020	41
100% idrol.	0,015	0,039	38

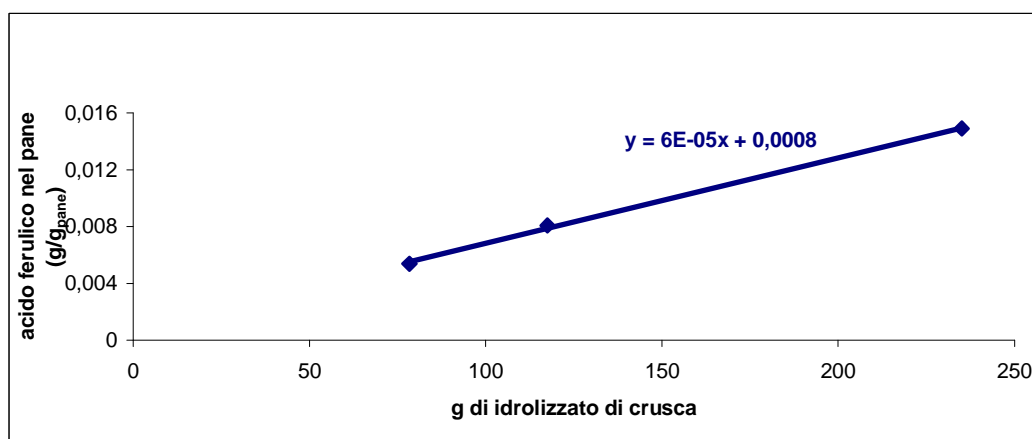


Figura 3-4: Determinazione della quantità di acido ferulico nei pani con diverso contenuto di idrolizzato di crusca

3.2.1.1 Prove aerobiche e anaerobiche

Per cercare di spiegare l'andamento riscontrato nelle analisi del potere antiossidante dei pani e studiare più dettagliatamente le interazioni tra idrolizzato di crusca e lievito si sono eseguite prove di fermentazione a diversa

concentrazione di idrolizzato e con una quantità di lievito proporzionale a quella presente nel pane.

Le prime prove di fermentazione sono state eseguite in condizioni aerobiche e anaerobiche su un campione di 25 ml di idrolizzato di crusca (*idrolizzato*, usato come bianco) e uno contenente 25 ml di idrolizzato e 0,5 g di lievito (*idrolizzato + lievito*) posti sotto blanda agitazione orbitale a 37 °C.

Di questi campioni si è determinato, a precisi intervalli di tempo, il potere antiossidante.

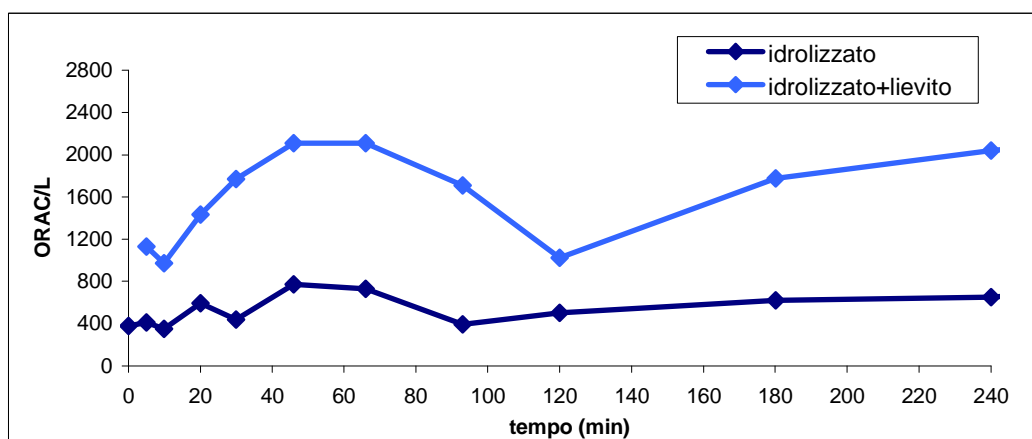


Figura 3-5: Determinazione del potere antiossidante di un campione contenente solo **idrolizzato** e di uno con **idrolizzato e lievito** durante una fermentazione aerobica

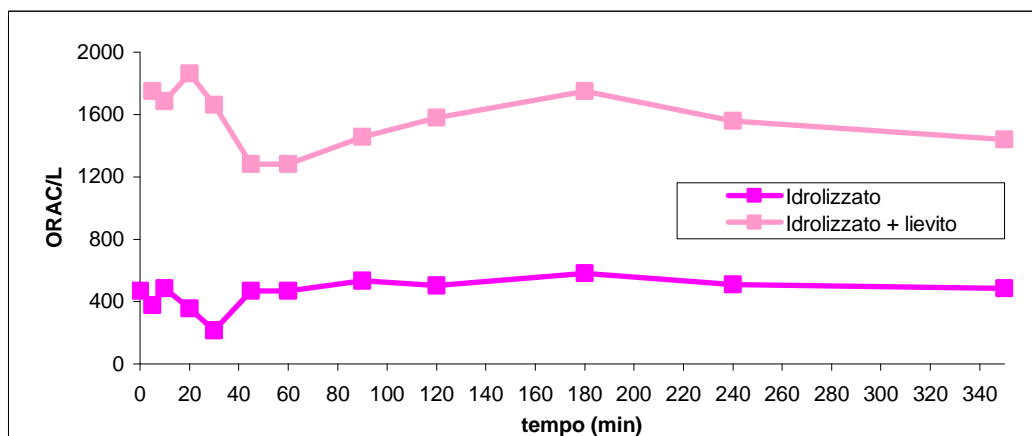


Figura 3-6: Determinazione del potere antiossidante di un campione contenente solo **idrolizzato** e di uno con **idrolizzato e lievito** durante una fermentazione anaerobica

I risultati ottenuti (Figura 3-5 e Figura 3-6) mostrano, in entrambe le prove, che in presenza di lievito il potere antiossidante è molto più elevato rispetto al campione in assenza. Il potere antiossidante è stato quindi determinato su tutti gli ingredienti

della fermentazione (*lievito*, *idrolizzato* e *idrolizzato+lievito*) così come su un campione a 0,5 g lievito in 25 ml tampone citrato/fosfato a pH = 5,8 (pH dell'idrolizzato di crusca) con in aggiunta 0,5 g di comune zucchero da cucina (*zucchero+lievito*).

Si nota come il potere antiossidante del lievito e del lievito+zucchero sia inferiore rispetto a quello dell'idrolizzato e soprattutto rispetto all'idrolizzato+lievito escludendo quindi un fenomeno di additività dei poteri antiossidanti degli ingredienti . (Figura 3-7).

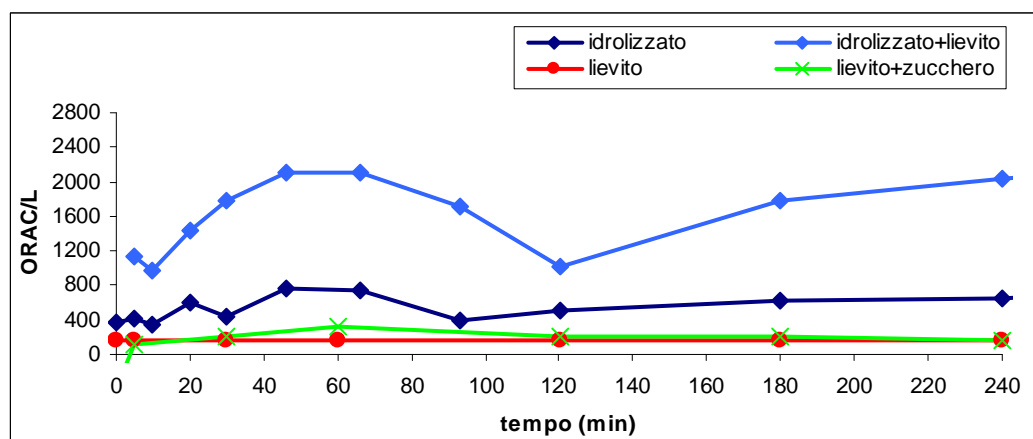
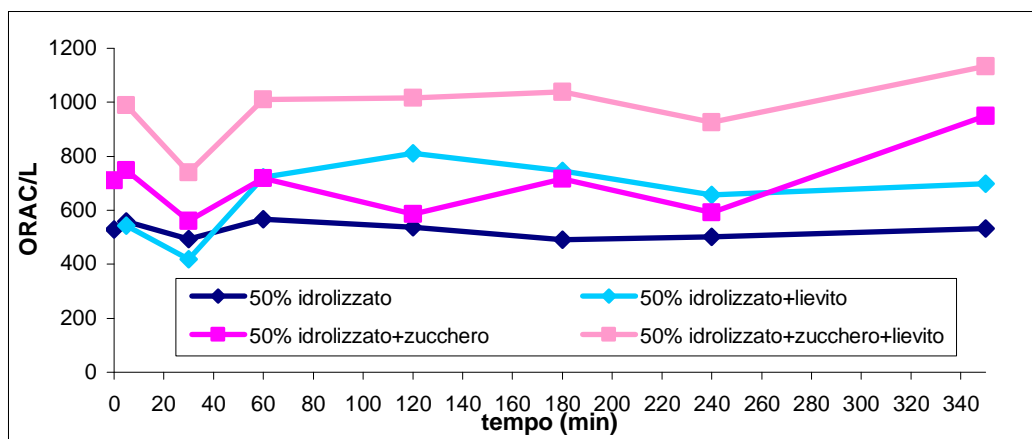


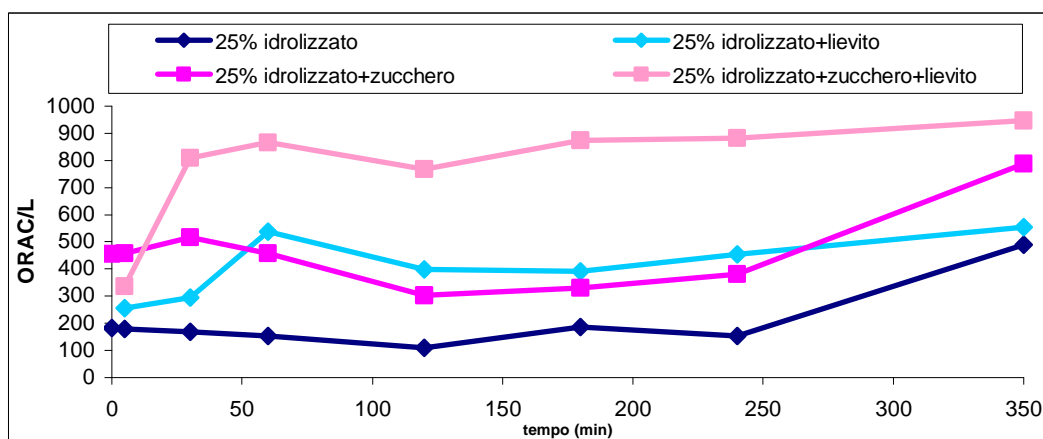
Figura 3-7: Determinazione del potere antiossidante dei vari ingredienti presenti nel pane (*idrolizzato*, *idrolizzato+lievito*, *lievito* e *lievito+zucchero*) durante una prova di fermentazione

3.2.1.2 Prove di fermentazione a diversa concentrazione di idrolizzato di crusca con e senza zucchero

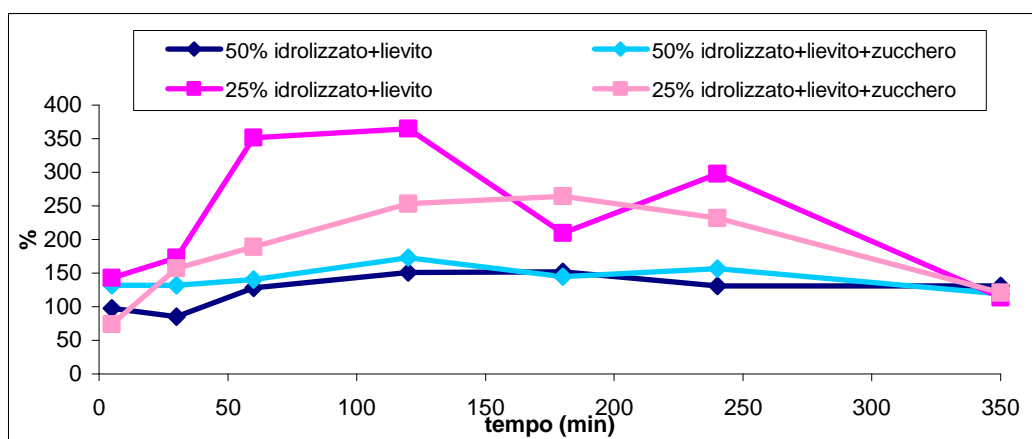
Il potere antiossidante sembra essere legato strettamente alla crescita del lievito in presenza di idrolizzato di crusca come dimostrano le prove effettuate su due campioni sia in assenza che in presenza di zucchero: uno al 50% di idrolizzato di crusca in tampone citrato/fosfato a pH 5,8 (*idrolizzato 50%*) e l'altro al 25% di idrolizzato (*idrolizzato 25%*) (Figura 3-8). Si nota che in presenza di zucchero il potere antiossidante è maggiore, ma gli andamenti sono molto simili, quindi per semplificare il sistema si è deciso di eliminare lo zucchero nelle prove successive (Figura 3-8).



(a)



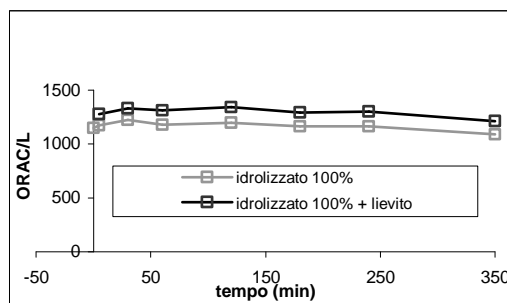
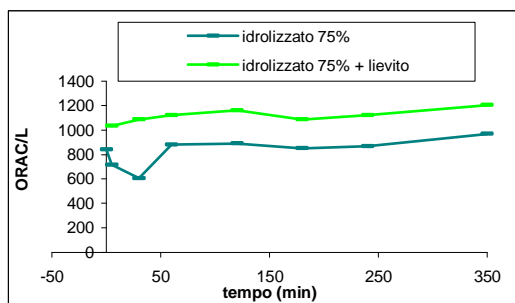
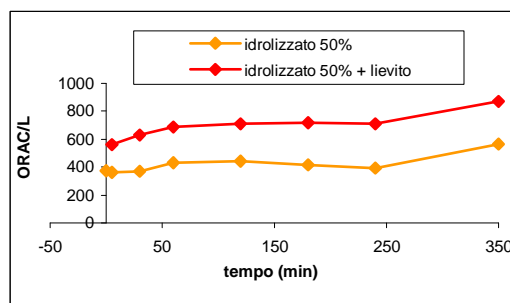
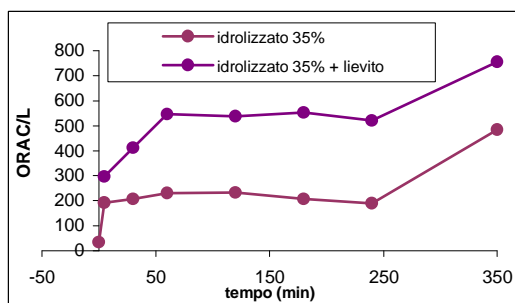
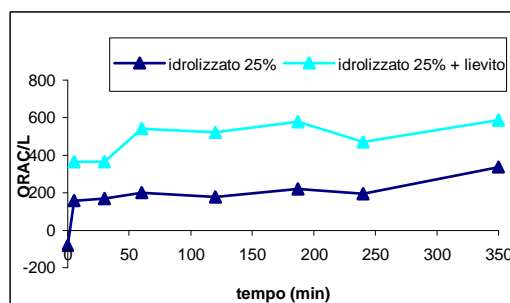
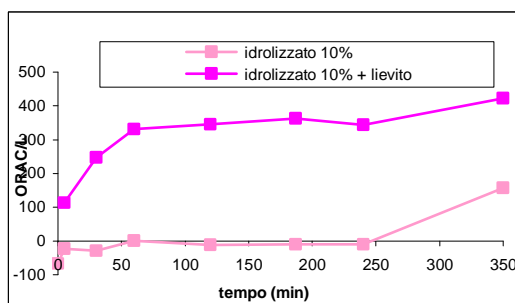
(b)



(c)

Figura 3-8: Confronto tra il potere antiossidante (ORAC/L) di soluzioni con e senza zucchero a diverse percentuali di idrolizzato: 25% (a) e 50% (b) con e senza lievito durante una prova di fermentazione e confronto percentuale tra il potere antiossidante del campione con lievito con e senza zucchero per le due concentrazioni in esame (c)

3.2.1.3 Fermentazione dell'idrolizzato di crusca a diversa concentrazione in assenza zucchero



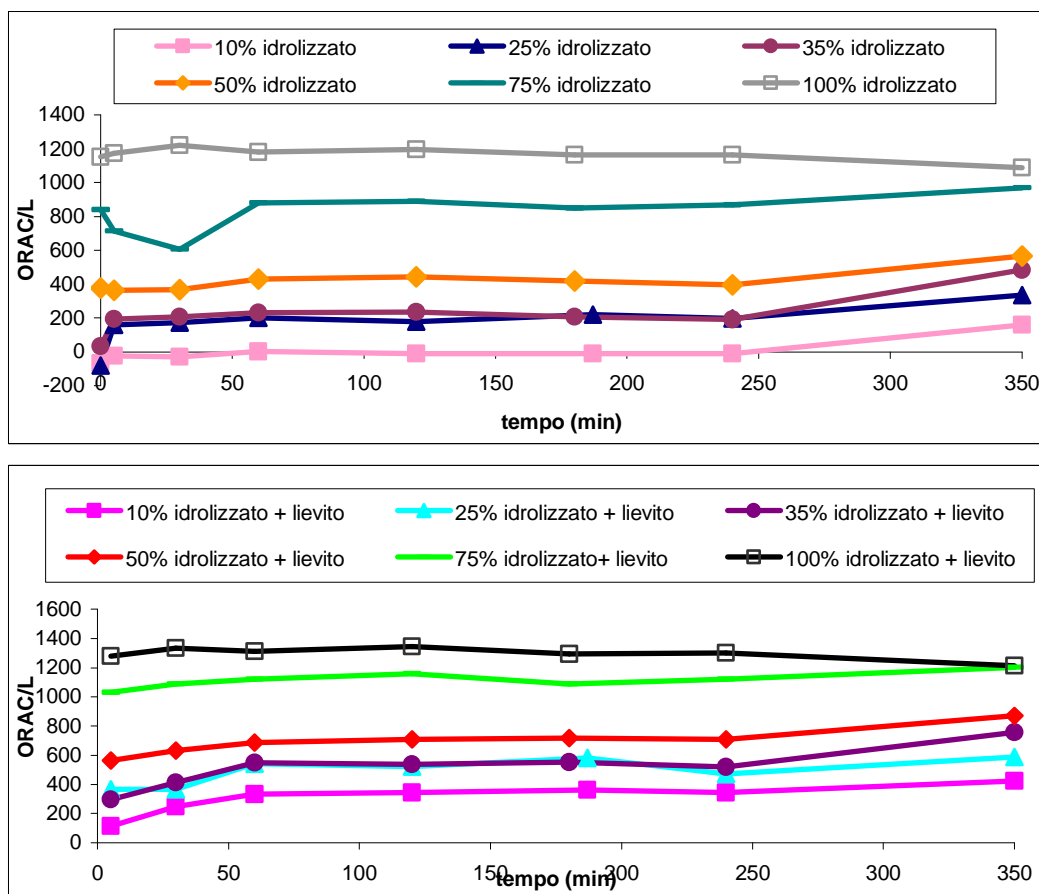


Figura 3-9: Determinazione del potere antiossidante di campioni a diversa percentuale di idrolizzato (10, 25, 35, 50, 75 e 100 %) con e senza lievito durante una prova di fermentazione

Lo screening di potere antiossidante (PAO) in presenza di varie concentrazioni di idrolizzato di crusca ha mostrato un incremento significativo dell'indice in presenza di lievito (Figura 3-9). Il valore di PAO incrementa proporzionalmente con l'aumentare della concentrazione di idrolizzato di crusca in assenza e in presenza di lievito (Figura 3-10). Tuttavia, la variazione dell'indice PAO risulta maggiore a bassa concentrazione di idrolizzato rispetto a quando il lievito agisce direttamente sul bio-liquefatto al 100%, coerentemente con l'andamento convergente riportato in Figura 3-10.

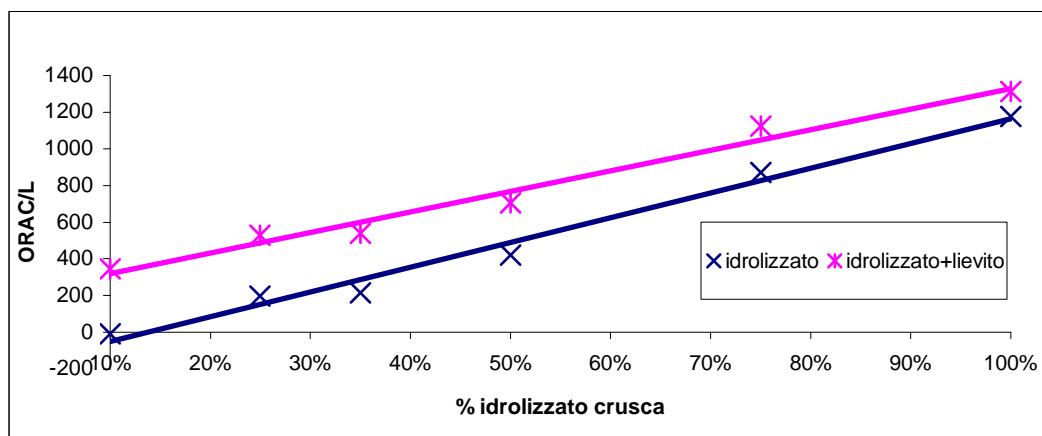


Figura 3-10: Potere antiossidante dei campioni con e senza lievito in funzione della percentuale di idrolizzato in soluzione

Se si grafica la differenza tra il potere antiossidante del campione con lievito e quello senza sulla percentuale di idrolizzato presente in soluzione (Figura 3-11), si nota come questo valore aumenti linearmente al diminuire della percentuale di crusca nel campione.

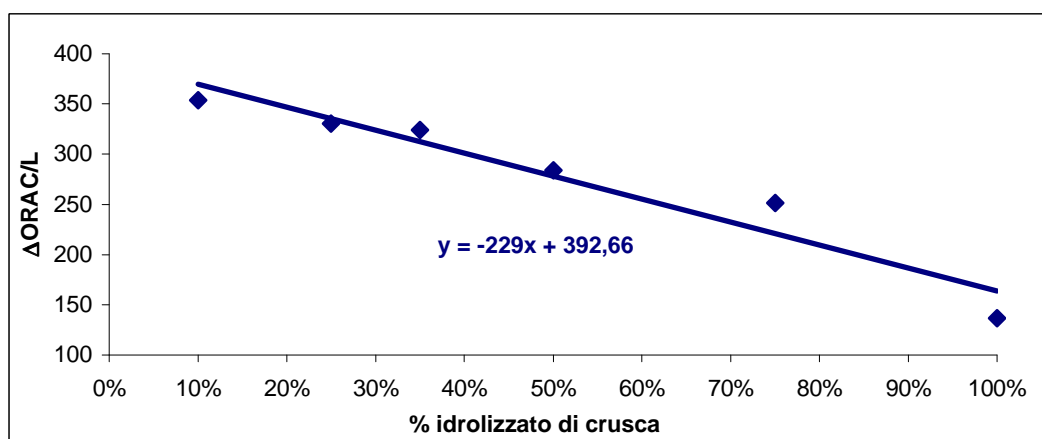


Figura 3-11: Differenza tra il potere antiossidante dei campioni con idrolizzato+lievito e quello con solo idrolizzato in funzione della percentuale di idrolizzato in soluzione

3.2.1.4 Determinazione acido ferulico durante le prove di fermentazione

La concentrazione di acido ferulico in soluzione tende a diminuire durante la reazione di fermentazione sia in assenza che in presenza di lievito (Figura 3-12). La maggiore variazione riscontrata in presenza di lievito lascia ipotizzare un'eventuale biotrasformazione dell'acido ferulico.

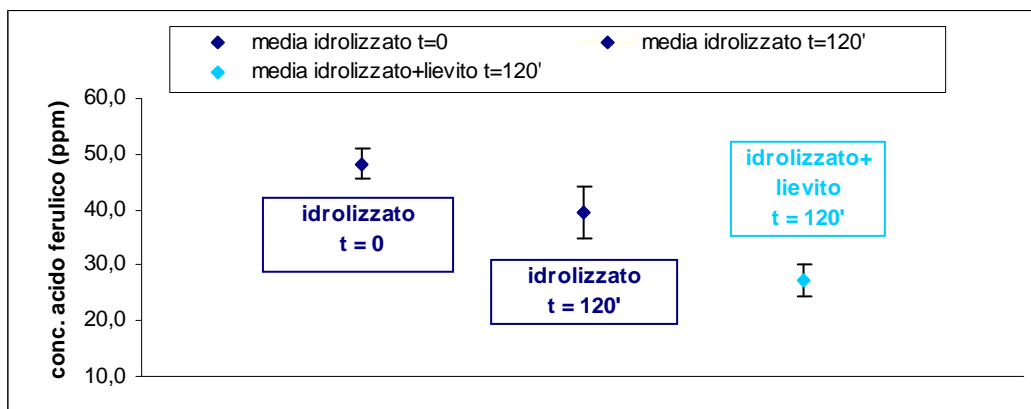


Figura 3-12: Determinazione della concentrazione acido ferulico tramite analisi in HPLC di un campione contenente solo idrolizzato a inizio fermentazione (**idrolizzato t = 0**) e dopo 120 minuti di fermentazione (**idrolizzato t = 120'**) e del corrispondente campione ma in presenza di lievito dopo 120 minuti di fermentazione (**idrolizzato+lievito t = 120'**)

Studi effettuati attraverso prove di fermentazione con soluzioni modello a concentrazione nota di acido ferulico hanno permesso di verificare l'evoluzione di questo composto durante le prove di fermentazione con il lievito.

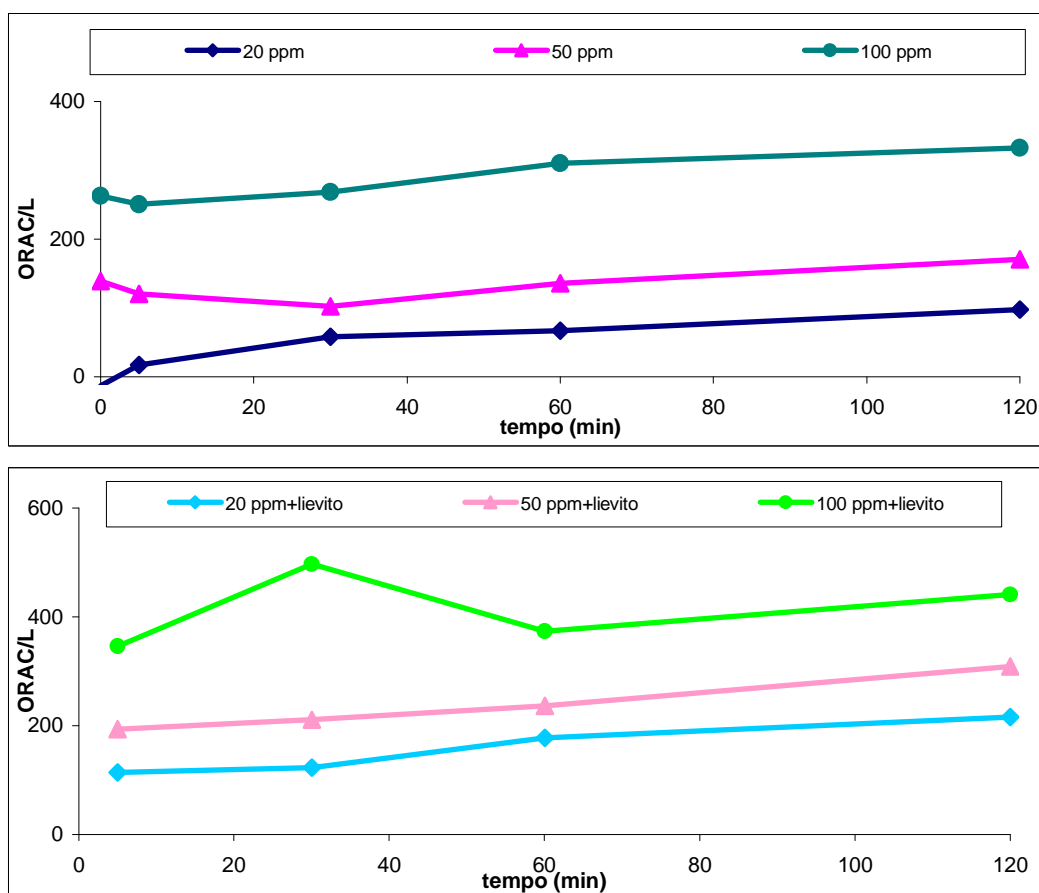


Figura 3-13: Determinazione del potere antiossidante di soluzioni standard di acido ferulico a 20, 50 e 100 ppm durante una prova di fermentazione

In generale l'andamento del potere antiossidante in funzione della concentrazione dei campioni contenenti acido ferulico in presenza di lievito è maggiore rispetto a quello dei campioni con solo ferulico (Figura 3-14) e questo risulta essere in accordo con quello visto nelle prove di fermentazione sull'idrolizzato di crusca svolte precedentemente e questo aumento è lineare aumentando la concentrazione di acido ferulico in presenza o in assenza di lievito (Figura 3-14).

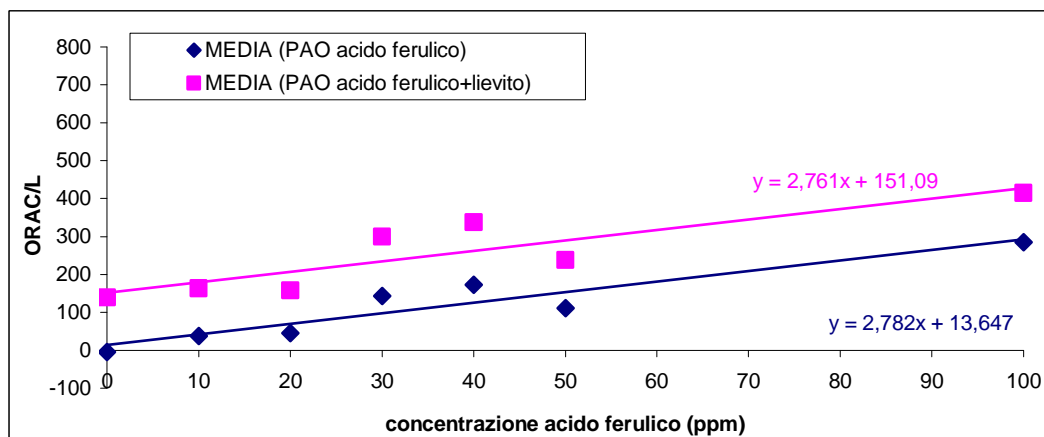


Figura 3-14: Potere antiossidante di campioni con solo **acido ferulico** e con **acido ferulico+lievito** in funzione della concentrazione di acido ferulico (da 0 a 200 ppm) presente in soluzione

Il contributo del lievito all'incremento del potere antiossidante per le varie concentrazioni di acido ferulico, espresso dalla differenza tra i valori di PAO in presenza e in assenza di lievito, (Figura 3-15), presenta un andamento lineare solo per ogni set di misure. Questo potrebbe però essere dovuto a differenze nei lieviti commerciali usati nelle diverse prove.

In generale vi è comunque una differenza con quanto osservato nelle prove con l'idrolizzato di crusca in cui si è osservato un maggiore incremento di PAO a basse concentrazioni di idrolizzato in soluzione, mentre in queste prove il contributo del lievito sembra essere abbastanza costante per le varie concentrazioni di acido ferulico.

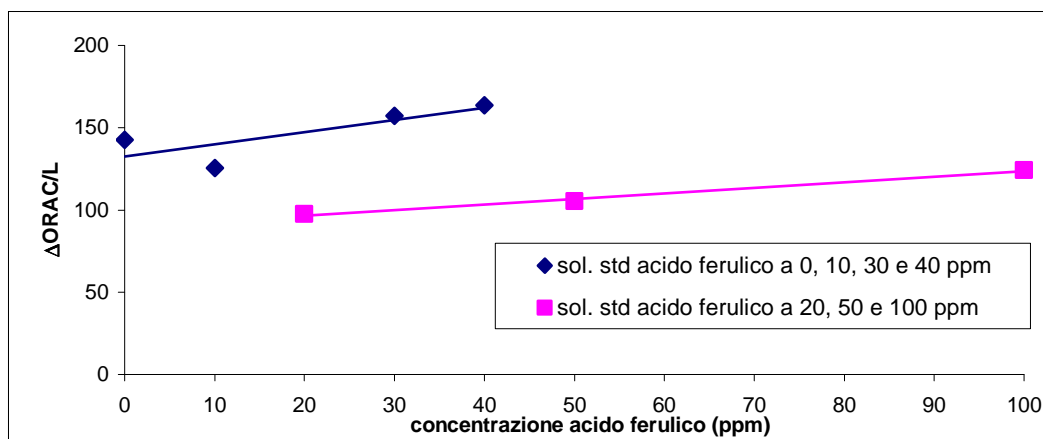
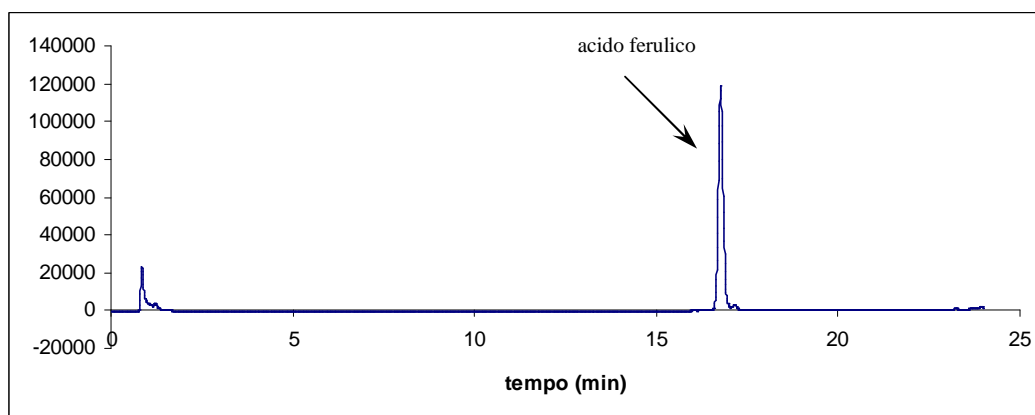
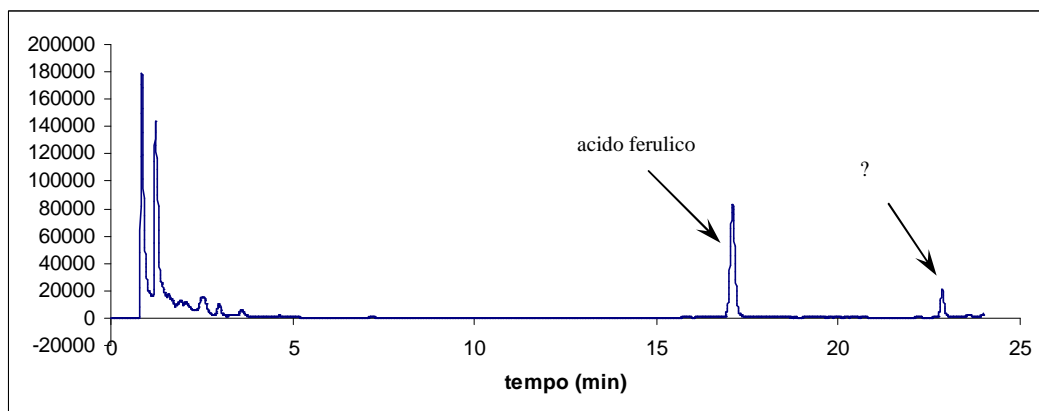


Figura 3-15: Contributo del lievito in funzione della concentrazione di acido ferulico in soluzione

L'analisi in cromatografia liquida ad alte prestazioni (in collaborazione con la Dr. Bernardi e il Prof. Medici dell'Università di Ferrara) del mezzo di reazione ha evidenziato la presenza di un nuovo picco incognito nel profilo cromatografico in presenza del lievito (Figura 3-16).



(a)



(b)

Figura 3-16: Cromatogrammi relativi: a un campione di soluzione standard di acido ferulico a fine fermentazione (a) e a un campione alla stessa concentrazione di acido ferulico, sempre a fine fermentazione ma con anche lievito (b)

Si è altresì osservata una diminuzione dell'acido ferulico nei campioni con lievito conseguente probabilmente alla comparsa del nuovo composto (Figura 3-17).

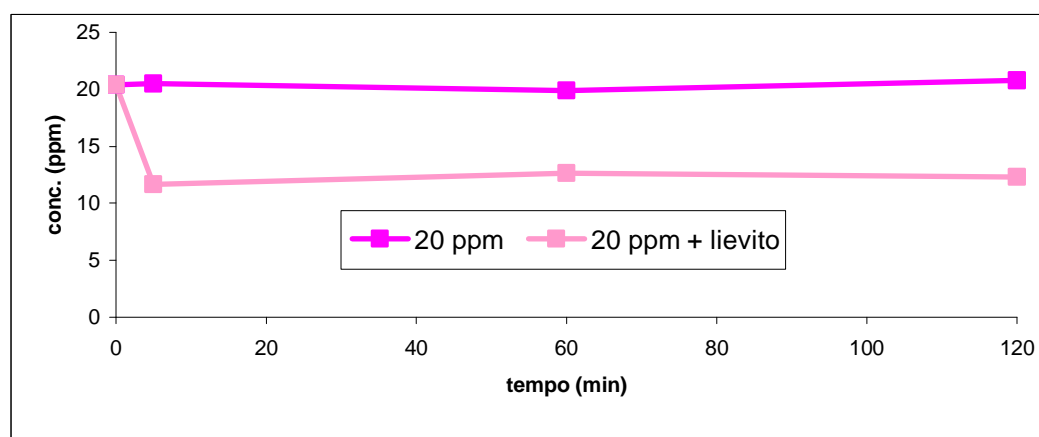


Figura 3-17: Concentrazione dell'acido ferulico, determinata in HPLC, in un campione a 20 ppm di acido ferulico senza e con lievito a diversi tempi di fermentazione

Tale diminuzione dell'acido ferulico nei campioni con lievito e la comparsa di un nuovo composto si riscontra in tutte le soluzioni a diversa concentrazione di ferulico e l'aumento dell'area del picco del campione incognito sembra inoltre essere proporzionale alla diminuzione del picco corrispondente all'acido ferulico (Figura 3-18).

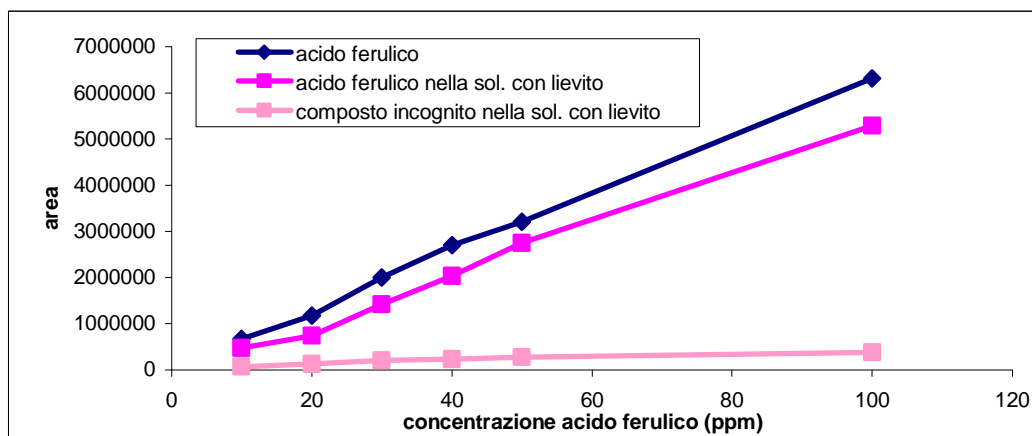


Figura 3-18: Area dei picchi relativi all'acido ferulico ed a un composto incognito nei campioni senza e con lievito delle prove di fermentazione a 10, 20, 30, 40, 50 e 100 ppm di acido ferulico

Seppure la differenza del potere antiossidante tra le soluzioni di ferulico con lievito e quelle senza, aumenta all'aumentare dell'area e quindi della concentrazione del composto incognito (Figura 3-19) soltanto all'interno del singolo set di prove (questo potrebbe essere dovuto solamente a differenze nei lieviti usati), questo andamento avvalorava ulteriormente l'ipotesi che l'aumento del potere antiossidante possa essere legato alla formazione di questo nuovo composto avente probabilmente un valore di PAO maggiore di quello dell'acido ferulico.

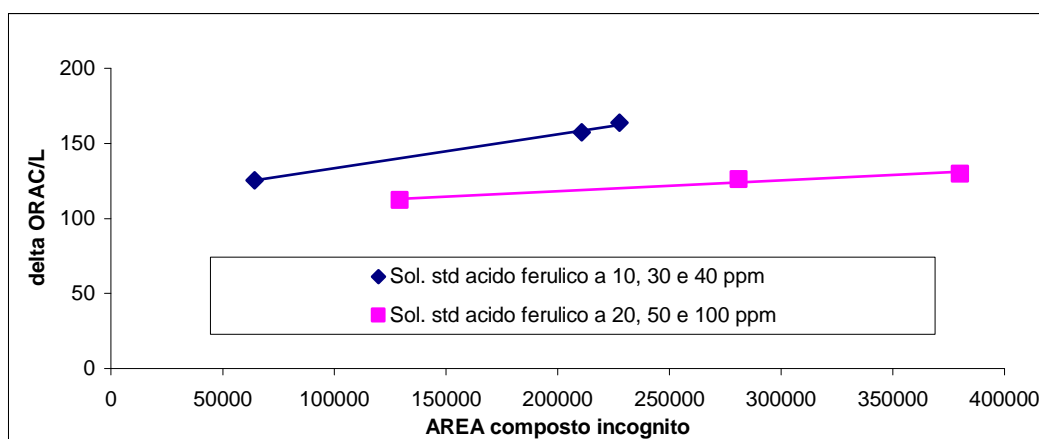


Figura 3-19: Differenza del potere antiossidante delle soluzioni a 10, 20, 30, 40, 50 e 100 ppm di acido ferulico con e senza lievito in funzione dell'area del nuovo composto incognito presente nelle soluzione con lievito

Huag et al (1993)⁶¹ hanno riportato un meccanismo di trasformazione dell'acido ferulico in 4-idrossi-3-metossistirene ad opera del *S. Cerevisiae* (Figura 3-20).

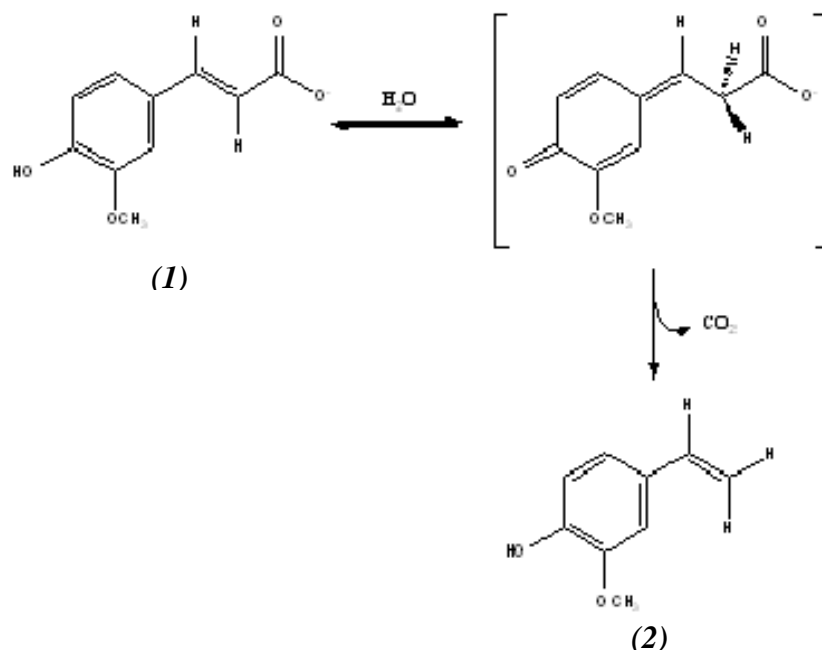


Figura 3-20: Trasformazione dell'acido ferulico (1) in 4-idrossi 3 metossistirene (2) in presenza di *S. Cerevisiae*

Tale composto presenta un alto potere antiossidante⁶² confermato anche dalle prove in vitro con il metodo del DPPH, in cui il potere antiossidante di uno standard di 4-idrossi 3-metossistirene è risultato molto elevato rispetto a quello dell'acido ferulico (Tabella 3-2).

Tabella 3-2: Potere antiossidante acido ferulico e 4-idrossi 3-metossistirene

	ORAC/ppm
<i>Acido ferulico</i>	3,2 ± 0,2
<i>4-idrossi 3-metossistirene</i>	600 ± 30

La conferma della possibilità di questa trasformazione dell'acido ferulico è stata dimostrata anche da una prima prova preliminare in HPLC: l'analisi di uno standard di 4-idrossi 3 metossistirene e di un campione di fermentazione di acido ferulico + lievito, ha mostrato che il tempo di ritenzione dello standard coincide con quello del picco del composto incognito delle prove di fermentazione del campione con acido ferulico + lievito.

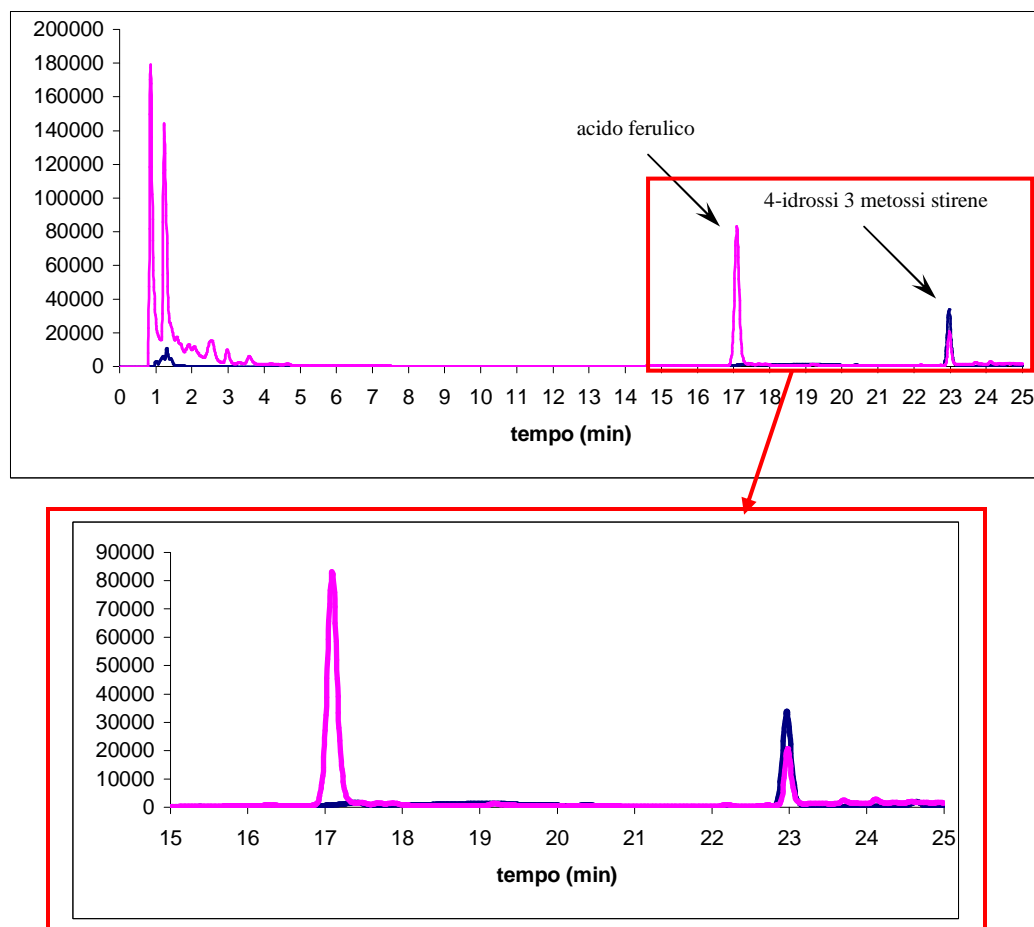


Figura 3-21: cromatogramma di un campione di fermentazione di una soluzione di acido ferulico + lievito (riga rosa) e di una soluzione standard di 4 idrossi 3 metossistirene (riga blu)

Al giorno d'oggi il 4-idrossi 3-metossistirene, uno dei composti responsabili dell'aroma naturale del grano saraceno, è una sostanza aromatica classificata come agente aromatizzante da un incontro FAO/OMS di esperti sugli additivi alimentari.⁶³ Questo dato sperimentale risulta quindi aggiungere un importante valore commerciale all'utilizzo di idrolizzati arricchiti di acido ferulico in quanto precursori di uno degli aromi di riferimento per la panificazione. L'alto potere antiossidante di questo composto lo rende poi ulteriormente interessante per conferire funzionalità all'alimento oltre che un significativo miglioramento organolettico.

Tabella 3-3: Riassunto delle valutazioni effettuate dal Joint FAO/OMS di esperti sugli additivi alimentari

2-METHOXY-4-VINYLPHENOL	
COE No.:	177
FEMA No.:	2675
JECFA No.:	725
Chemical names:	2-METHOXY-4-VINYLPHENOL
Synonyms:	4-HYDROXY-3-METHOXYSTYRENE; p-VINYLCATECHOL-o-METHYLETHER; p-VINYLGUAIACOL
Functional class:	FLAVOURING AGENT
Latest evaluation:	2000
ADI:	ACCEPTABLE
Comments:	No safety concern at current levels of intake when used as a flavouring agent
Report:	TRS 901-JECFA 55/44
Specifications:	COMPENDIUM ADDENDUM 8/FNP 52 Add.8/172
Tox monograph:	FAS 46-JECFA 55/165

3.3 Pane con mix di idrolizzato d'uva e oliva

Se da una parte l'aggiunta di idrolizzato di crusca rappresenta un approccio logico e fisiologico per fortificare il pane, dall'altra l'aggiunta di idrolizzati derivanti da uva e olive possono rappresentare interessanti apporti di elementi funzionali tipici di ingredienti che si possono trovare nel pane o possono essere accompagnati con esso.

L'aggiunta di ingredienti attivi su base acquosa è stata eseguita attraverso la sostituzione di parte del contenuto d'acqua con l'idrolizzato. Tale operazione è possibile quando il contenuto in principi attivi dell'idrolizzato è sufficientemente concentrato. Inoltre, il passaggio su scala industriale di questa applicazione potrebbe necessitare una movimentazione considerevole di volumi acquosi che implica costi di trasporto e stabilità dell'ingrediente per un'eventuale conservazione in magazzino. Per queste ragioni, l'utilizzo dei principi attivi sottoforma di polveri può rispondere parzialmente o addirittura completamente a queste esigenze.

Per queste prove è stato utilizzato un mix di antiossidanti proveniente da bio-liquefatti di vinacce di uve rosse e di acque di vegetazione di olive.

3.3.1 Valutazione sperimentale del mix d'uva e oliva: sinergia di effetto antiossidante

Sono stati miscelati i principi attivi in forma acquosa e analizzati per valutarne eventuali effetti sinergici.

Per quanto riguarda la sinergia di ogni singolo pool si è visto come i pool fenolici degli idrolizzati d'oliva e d'uva presentino un elevato potere antiossidante in vitro rispetto ad alcuni estratti o molecole pure note e presenti sul mercato (Figura 3-22).

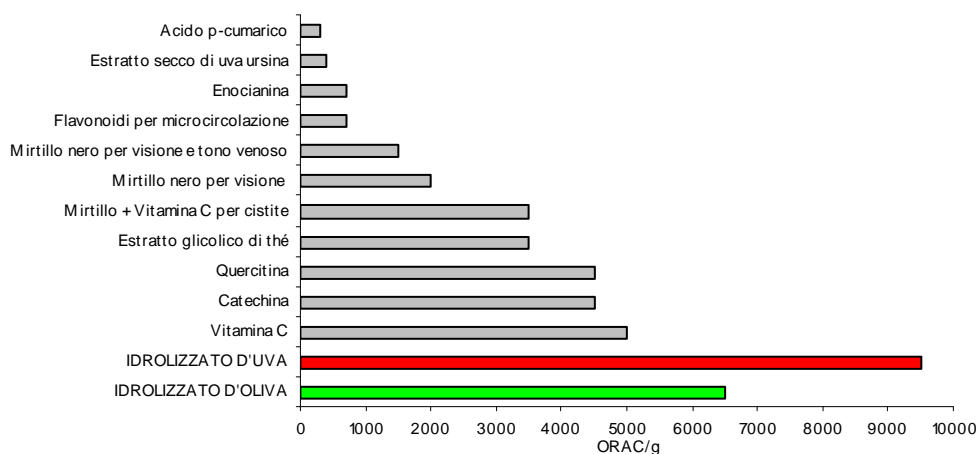


Figura 3-22: Confronto tra il potere antiossidante dell'idrolizzato d'oliva e d'uva e soluzioni di altre sostanze antiossidanti commerciali

Le miscele a diversi rapporti di concentrazione tra bio-liquefatto di uva e quello di oliva hanno mostrato comportamenti non additivi dell'attività antiossidante rispetto al PAO dei singoli componenti (Figura 3-23).

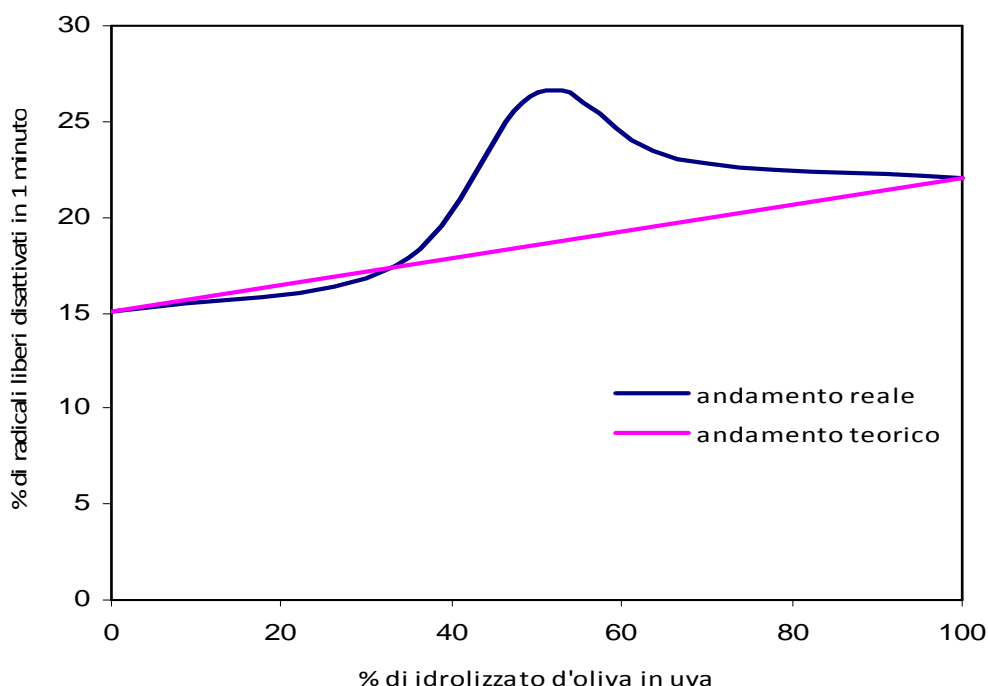


Figura 3-23: Confronto tra l'andamento **teorico** e **reale** del mix di idrolizzato d'oliva in uva

Questa differenza risulta molto evidente (Figura 3-23) nella miscela con circa il 50% di idrolizzato d'oliva e il 50% di idrolizzato d'uva nella quale l'effetto sinergico porta ad un aumento dell'attività radicalica del 32%. Tale incremento si può attribuire ad una sorta di super attività del potere antiossidante del bio-liquefatto di olive che non è ancora chiare e necessita di ulteriori approfondimenti.

3.3.2 Test in uso del mix di idrolizzato d'oliva e uva

Il mix di idrolizzato d'oliva e uva ha un contenuto di polifenoli fino a 50 volte superiore rispetto ad un olio extravergine di oliva e che i polifenoli dell'oliva “possono contribuire a beneficio della salute, migliorando la protezione contro i maggiori fattori di rischio per le malattie cardiovascolari”⁶⁴.

Uno dei principali fattori di rischio per questa tipologia di problematiche è il livello colesterolemico, in particolare i livelli di colesterolo HDL o “buono”, che ha effetti positivi sulla circolazione, e di colesterolo LDL o “cattivo” che invece tende maggiormente a depositarsi nei vasi sanguigni aumentando il rischio di disturbi⁶⁵.

Negli anni sono stati eseguiti molti studi sul potenziale effetto protettivo degli antiossidanti fenolici rispetto ai fattori di rischio per i disturbi cardiocircolatori. In

particolare nel 2006 è stato dimostrato come l'assunzione di polifenoli da uva rossa, generalmente presenti nella dieta Mediterranea grazie all'apporto dovuto al consumo di vino rosso, porti a una significativa riduzione della concentrazione sanguigna di colesterolo LDL ed ad un altrettanto rilevante aumento della concentrazione del colesterolo HDL⁶⁶. Un'analoga ricerca, condotta in Europa su vasta scala, ha dimostrato come l'utilizzo di olio extravergine d'oliva ad elevato contenuto di polifenoli causi un significativo aumento del colesterolo HDL⁶⁷.

Alla luce di queste ricerche risulta quindi molto importante seguire una dieta sana e che apporti una quantità appropriata di antiossidanti specifici per prevenire l'insorgenza di problemi cardiocircolatori. Per facilitare e integrare l'assunzione di antiossidanti nella dieta e nella vita quotidiana, l'uso di un mix di idrolizzato d'oliva e uva, come integratore o come ingrediente funzionalizzante, potrebbe essere molto importante e utile in quanto consente di assumere e assimilare facilmente una buona quantità di polifenoli antiossidanti.

Al fine di valutare l'efficacia di tale mix nella modulazione del colesterolo e nella riduzione dei fattori di rischio per il sistema cardiocircolatorio, si è effettuato un test in uso di tale mix su 19 volontari di ambo i sessi di età compresa tra i 25 e i 64 anni (media $39,5 \pm 15$). Il test prevedeva l'assunzione, 2 volte al giorno (mattina e sera) per 4 settimane di 0,16 grammi di mix (0,32 grammi/giorno). Prima di iniziare il trattamento ed al termine del medesimo sono stati misurati i livelli sanguigni di colesterolo LDL, HDL e i rapporto colesterolo totale/HDL, parametri predittivi per il rischio cardiocircolatorio.

Al termine di tale studio si è osservato che una regolare assunzione di fenoli derivanti da uva e olive può aiutare a rimodulare positivamente il profilo colesterolemico del sangue: si è visto infatti che il colesterolo LDL, "cattivo", si è mediamente ridotto del 6% (Figura 3-24), mentre quello HDL, "buono", è aumentato del 10,6% (Figura 3-25).

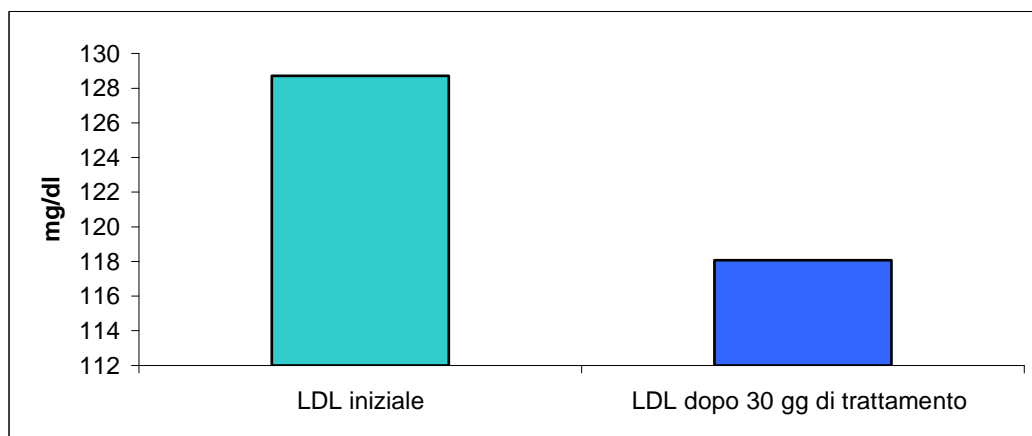


Figura 3-24: Colesterolo LDL (cattivo) prima e dopo il trattamento con mix d'oliva e uva

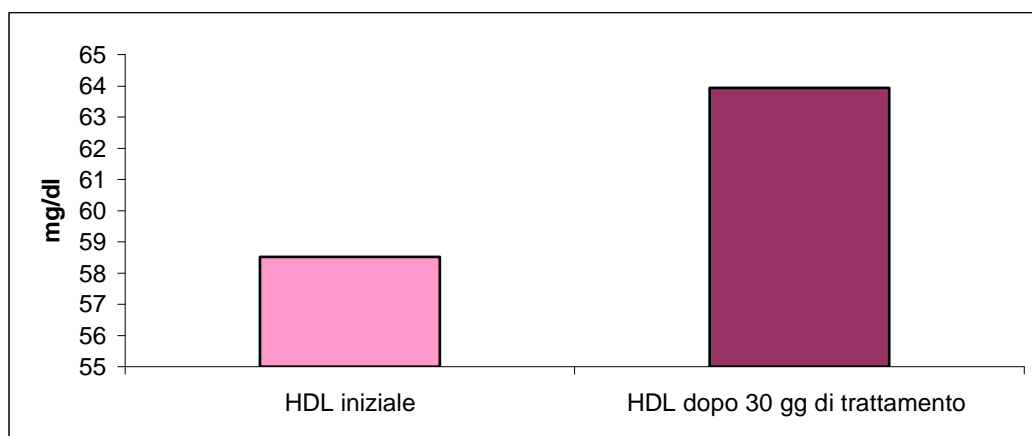


Figura 3-25: Colesterolo HDL (buono) prima e dopo il trattamento con mix d'oliva e uva

Durante questo test si è anche vista una diminuzione dell'11,3% del rapporto (IRC) tra colesterolo totale/colesterolo HDL (Figura 3-26).

Essendo stato dimostrato che un elevato IRC è uno dei fattori di rischio maggiormente collegati alla possibile insorgenza di problematiche cardiovascolari, tale rapporto, soprattutto in individui che presentano altri fattori di rischio (fumo, sovrappeso, vita sedentaria, ecc.), dovrebbe essere il più basso possibile e comunque inferiore a 4⁶⁸. Quindi, la diminuzione di tale rapporto con l'assunzione del mix d'uva e oliva riafferma il contributo che esso può dare in termini di prevenzione dell'insorgenza di complicazioni del sistema cardiocircolatorio.

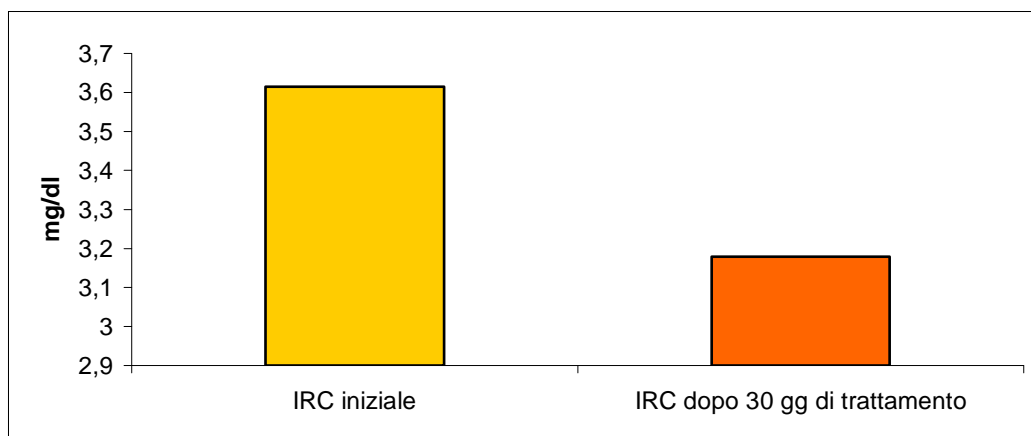


Figura 3-26: Rapporto CT/HDL (IRC) prima e dopo il trattamento con mix d'oliva e uva

3.3.3 Mix in polvere nel pane

Visti i buoni risultati ottenuti dal test in uso del mix d'oliva e uva assunto sotto forma di integratore, si è pensato di provare ad aggiungerlo anche in alcuni alimenti.

Un'azienda produttrice di farine e prodotti da forno (Varvello) ha provato l'utilizzo di questo mix all'interno delle proprie farine e quindi dei prodotti da forno finiti. Per aggiungere però questo mix di idrolizzati alle farine, era necessario avere il prodotto in forma solida (polvere). Si è così eseguito un processo di liofilizzazione del mix di oliva e uva e, una volta ottenuto, è stato aggiunto alle farine e utilizzato per la preparazione di pani funzionalizzati.

Su entrambi i prodotti (liofilizzato del mix e pane fornitoci da Varvello) si è eseguita la determinazione del potere antiossidante per vedere se tale funzionalità rimaneva anche in seguito al processo di liofilizzazione e al processo di produzione del pane.

La liofilizzazione è un processo tecnologico che permette l'eliminazione dell'acqua da una sostanza organica con il minor deterioramento possibile della sua struttura e dei suoi componenti.

Il processo consiste in una prima fase di congelamento della soluzione per far passare l'acqua a ghiaccio e successivo essiccamento attraverso la sublimazione del ghiaccio.

In questo caso si è liofilizzata una soluzione composta per il 75% da idrolizzato d'uva in oliva e il 25% di farina di kamut (come materiale di supporto) ottenendo così un solido che poi si è andato a macinare per essere addizionato alla farina

(Figura 3-27) utilizzata per la preparazione di vari prodotti da forno (pane, pizza,...).

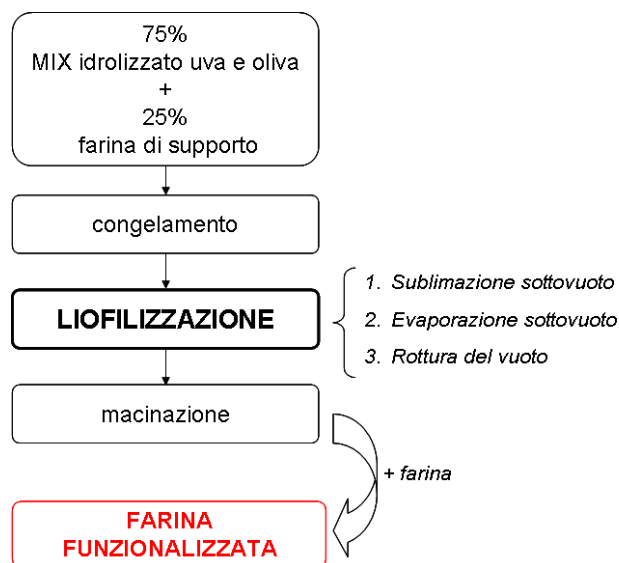


Figura 3-27: Schema a blocchi di un processo per ottenere una farina funzionalizzata con un mix di idrolizzato d’oliva e uva liofilizzato

3.3.3.1 *Controllo del mantenimento del potere antiossidante dopo liofilizzazione e panificazione*

Il potere antiossidante misurato sperimentalmente con il metodo del DPPH del mix d’uva e oliva liofilizzato è risultato pari a 45000 ORAC/L.

Sapendo la composizione di partenza della soluzione da liofilizzare (75% mix d’uva e oliva + 25% farina di kamut), avendo prima misurato il potere antiossidante dello stesso mix ma in forma di idrolizzato liquido (17000 ORAC/L), della farina di kamut (100-200 ORAC/L), il cui contributo risulta essere non significativo rispetto a quello del mix, e avendo ottenuto un liofilizzato secco finale del 28% si può calcolare il potere antiossidante teorico del mix liofilizzato di uva e oliva che risulta essere di circa 45500 ORAC/L, in linea con il valore trovato sperimentalmente.

3.3.3.2 *Pane con mix d’oliva e uva liofilizzato*

Dimostrato il mantenimento delle proprietà antiossidanti del mix d’idrolizzato d’oliva e d’uva anche dopo liofilizzazione, esso è stato usato (da Varvello, importante azienda di farine) per la preparazione di un pane funzionalizzato attraverso miscelazione con le normali farine.

Dall'analisi di un pane preparato solo con farina tradizionale e uno con aggiunta di mix liofilizzato, si evidenzia un'elevata differenza, in termini di potere antiossidante, tra le due formulazioni (Figura 3-28).

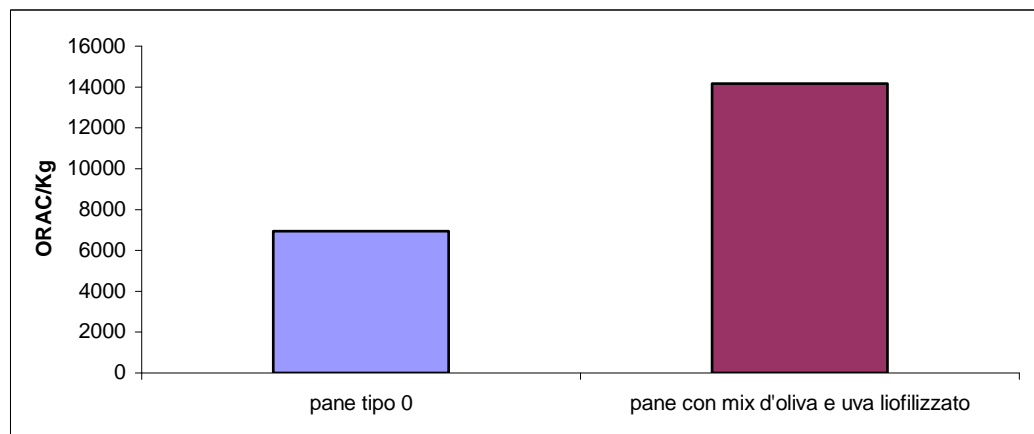


Figura 3-28: Potere antiossidante di un pane con farina normale (tipo 0) e di un pane con aggiunta di mix d'oliva e uva liofilizzato

Il potere antiossidante di questo pane funzionalizzato, confrontato con le analisi effettuate su un altro pane funzionalizzato con un estratto sempre proveniente da olive e uva ma prodotto diversamente, risultano comparabili avendo ottenuto per questo pane un ORAC/Kg pari a 16000.

3.4 Pasta all'uovo, formaggio e gelato con idrolizzato di oliva

Per quanto riguarda il pool completo dei polifenoli da olivo si sono trovati vari riferimenti che mettono in luce le sue importanti proprietà salutistiche:

- gruppi di volontari hanno mostrato un miglioramento dose dipendente dei marker di stress ossidativo assumendo giornalmente dosi note di polifenoli e idrossitirosolo da frutto di oliva (l'idrossitirosolo presente nel pool fenolico di oliva naturale viene assorbito in maniera dose dipendente dall'uomo)⁶⁹;
- altri hanno mostrato una minore suscettibilità del proprio DNA al danno ossidativo assumendo giornalmente dosi note di polifenoli e idrossitirosolo da oliva (DNA danneggiato – 30%)⁷⁰;

Alla luce di questo, alle analisi di mercato che vedono una gran richiesta di latte e derivati e pasta, e visto l'interessamento di diversi produttori, si è introdotto tale estratto in pasta all'uovo e formaggio e si è verificato il mantenimento delle

proprietà antiossidanti dell'idrolizzato tal quale anche all'interno del prodotto finito, quindi dopo vari processi di lavorazione.

Infine, vista il buon mercato occupato dal gelato, prodotto italiano riconosciuto in tutto il mondo per la sua qualità, e la nuova linea Olli lanciata da FUGAR (uno dei più grossi produttori e distributori italiani di basi per gelato) in cui tutti i grassi dei gusti crema sono stati sostituiti con olio d'oliva per puntare sull'utilizzo di grassi "più buoni" nella Dieta Mediterranea, oltre che per estendere il prodotto agli intolleranti al lattosio e vegani, si sono svolte alcune prime prove preliminari anche sulla funzionalizzazione di tale matrice con l'idrolizzato d'oliva. Visto che il bio-liquefatto prodotto da Phenbiox ha fino a 50 volte i fenoli dell'olio extravergine d'oliva ed è a base acqua potrebbe diventare un buon ingrediente per la formulazione di un gelato antiossidante fortificato sia nei gusti crema che in quelli frutta, che non prevedono l'utilizzo di grassi.

3.4.1 Pasta all'uovo

Per analizzare questo campione, dopo cottura e seguente frullatura del campione (paragrafo 5.8.1), in cui già si notava una differenza tra il campione con aggiunta di idrolizzato e quello senza (Figura 3-29), per provare a vedere meglio il contributo dell'idrolizzato, si è eseguito un trattamento enzimatico per disgregare meglio la matrice e liberare così l'idrolizzato presente all'interno.

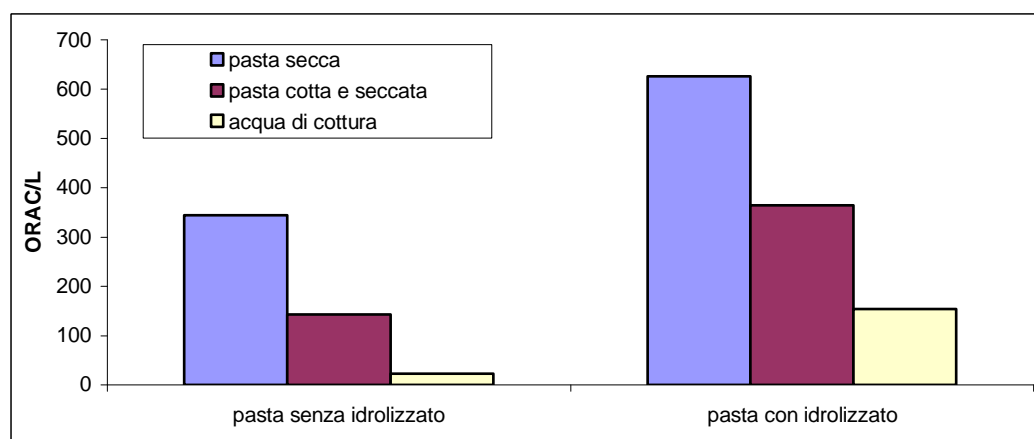


Figura 3-29: Potere antiossidante della pasta all'uovo con e senza idrolizzato d'oliva prima della cottura (**pasta secca**), dopo cottura (**pasta cotta e seccata**) e dell'**acqua di cottura**

Dal trattamento enzimatico si è rilevata una differenza di potere antiossidante pari a 847 ORAC/Kg tra la pasta senza estratto e quella con estratto (Figura 3-30).

Questo risultato dimostra il mantenimento delle funzionalità dell'estratto dopo il processo di ottenimento e cottura del cibo funzionalizzato.

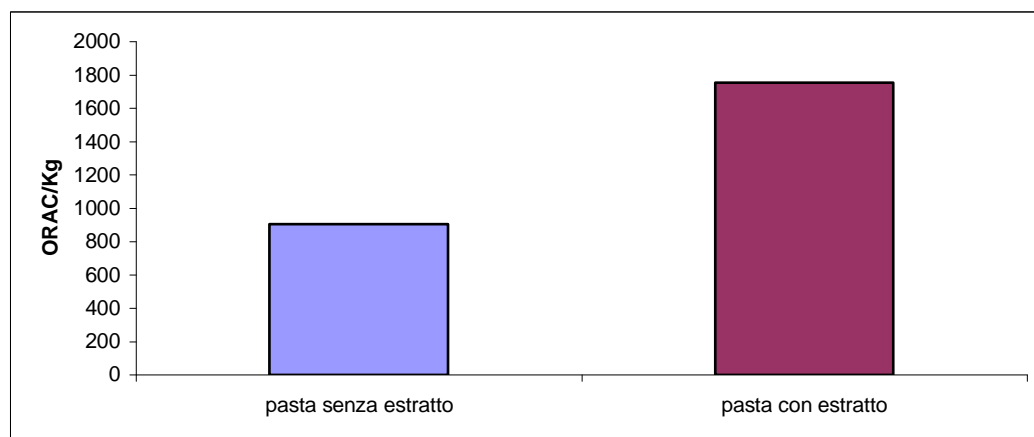


Figura 3-30: Potere antiossidante pasta all'uovo **senza** e **con** idrolizzato d'oliva dopo trattamento enzimatico

3.4.2 Formaggio fresco e pecorino

Sono stati analizzati anche campioni di formaggio fresco e pecorino prodotti con e senza idrolizzato d'oliva sempre dalla Fattoria Lischeto.

Le analisi sono stata eseguite sul prodotto tal quale e hanno mostrato, anche in questo caso (Figura 3-31), il mantenimento delle funzionalità dell'idrolizzato d'oliva visto che il formaggio fresco con idrolizzato ha un potere antiossidante maggiore di 20131 ORAC/Kg rispetto a quello normale e invece, per quanto riguarda il pecorino, la differenza tra prodotto funzionalizzato e non è pari a 2589 ORAC/Kg.

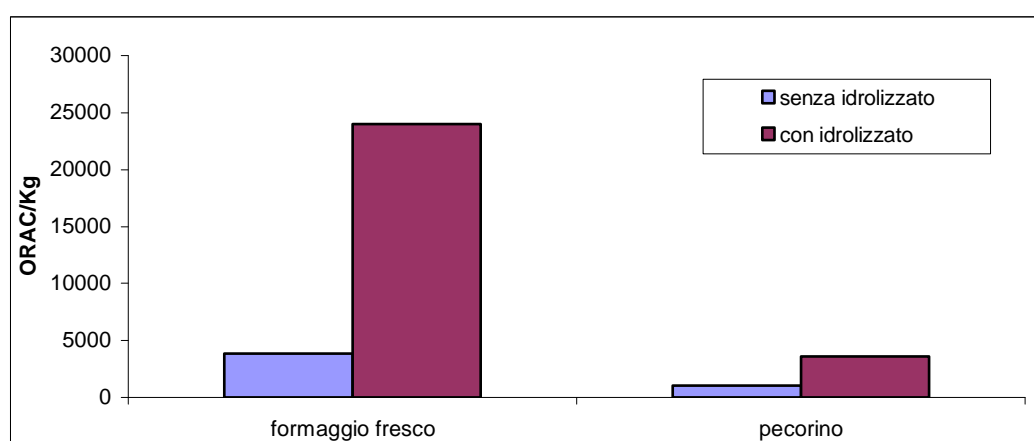


Figura 3-31: Potere antiossidante formaggio fresco e pecorino senza e con idrolizzato d'oliva aggiunto

3.4.3 Gelato

Per quanto riguarda il gelato, si sono addizionate ad un gelato artigianale diverse percentuali (1, 3, 5 e 7 %) di idrolizzato d'oliva per vedere se il potere antiossidante dell'idrolizzato veniva mantenuto anche nel prodotto finale.

Il gelato con l'idrolizzato d'oliva aggiunto non presenta visivamente differenze a seguito delle varie percentuali inserite ed anche al gusto non si riscontrano cambiamenti di sapore. Questo è un aspetto importante in previsione della possibilità di introdurre tale idrolizzato in basi per gelato per la produzione di diversi gusti perché non va ad alterare il tipico e abituale gusto, ma introduce solamente proprietà positive intrinseche all'idrolizzato e, se usato come sostituto di altri grassi presenti nel gelato, va ad apportare benefici anche dal punto di vista calorico e salutistico.

L'analisi del potere antiossidante ha mostrato un aumento proporzionale alla quantità di idrolizzato aggiunta (Figura 3-32).

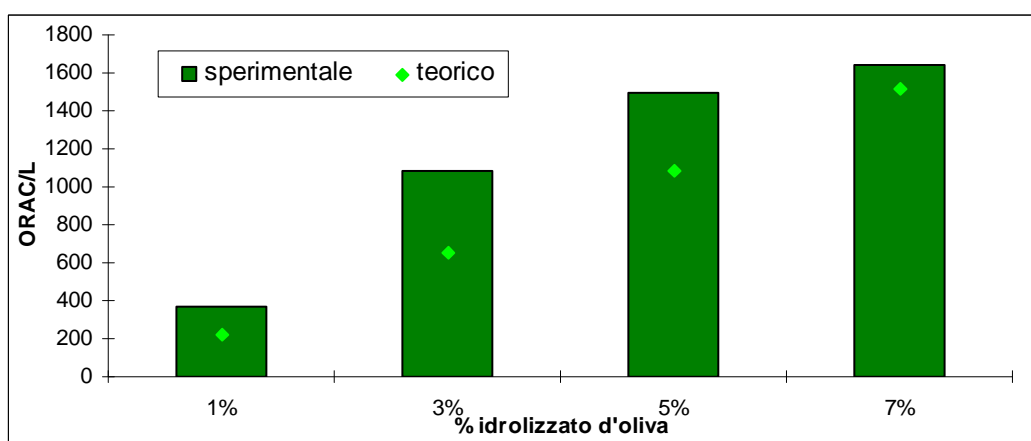


Figura 3-32: Potere antiossidante gelato con idrolizzato d'oliva

3.5 Estratti idro-enzimatici glicerici (e.i.e.)

Lo scarso contenuto di acqua nell'impasto per la produzione di pasta secca o di prodotti da forno come i biscotti impedisce l'utilizzo di idrolizzati acquosi non sufficientemente concentrati. Allo stesso modo l'aggiunta di farine funzionali in quantità eccessive può alterare le qualità organolettiche degli impasti e la loro consistenza. Per questo motivo sono stati utilizzati estratti idro-enzimatici (e.i.e.), ad alta concentrazione di principi attivi, preparati inizialmente per una linea erboristica partendo da una ricerca bibliografica mirata sulle possibili proprietà

benefiche delle varie piante. Questi estratti sono frutto di trattamenti enzimatici di bioliquefazione eseguiti sul vegetale in acqua tramite specifici enzimi naturali che sfibrano il vegetale e lo rendono solubile in acqua. La successiva aggiunta di glicerina (di origine vegetale) massimizza l'estrazione portando all'ottenimento dei nuovi e.i.e. (paragrafo 3.5) nei quali la quantità di pianta officinale e quindi di principi attivi è assolutamente massimizzata.

Alcuni di questi estratti hanno poi trovato impiego come ingredienti funzionali in vari alimenti da forno (pasta secca, biscotti e pane azzimo) fornitici dalla ditta Adama.

Anche per questi alimenti, si è studiato il mantenimento del potere antiossidante dopo il processo di preparazione del prodotto finito.

3.5.1.1 Pasta di semola di grano duro con e.i.e. di tiglio e withania

Il primo prodotto analizzato è stato una pasta secca, prodotta tramite essiccazione a bassa temperatura (55/60 gradi) in modo da lasciarne inalterate tutte le proprietà attive e nutritive, funzionalizzata con l'1% di estratti idro-enzimatici di tiglio e withania. Poi è stata esaminata una pasta, ottenuta con lo stesso procedimento, ma senza nessun estratto aggiunto.

Le più rivelanti proprietà terapeutiche del tiglio, ricco di flavonoidi e di cumarine e contenente anche acidi caffeico, clorogenico e cumarico, vitamina C e una certa quantità di tannini, sono l'azione sedativa a livello cerebrale e l'azione antispasmodica viscerale^{71,72}. Studi recenti sulla withania, composta da una serie di lattoni steroidei detti withanolidi e da withaferina A, oltre che da alcuni alcaloidi (withanina, withaninina nicotina e tracce di scopoletina)⁷³, riscontrano invece una sua attività antistress e quindi il suo utilizzo come energetico. La withania, inoltre, agisce su molteplici distretti dell'organismo ed in particolare è molto attiva sul sistema nervoso, sull'apparato muscolare, respiratorio e riproduttivo. Il fitocomplesso della radice, caratterizzato prevalentemente da alcaloidi e saponine, ha infine dimostrato interessanti proprietà ipnotiche e sedative, soprattutto in presenza di stati ansiosi.⁷⁴

Attraverso la determinazione del potere antiossidante dei due estratti idro-enzimatici (Tabella 3-4) è possibile calcolare il potere antiossidante teorico nella

pasta che, contenendo l'1% dei due e.i.e dovrebbe avere un potere antiossidante di 170 e i 200 ORAC/Kg (Tabella 3-4).

Tabella 3-4: Potere antiossidante e.i.e. di tiglio e withania e PAO della pasta calcolato teoricamente sapendo che è stato aggiunto l'1% di e.i.e. di tiglio e withania

	ORAC/Kg
<i>Tiglio</i>	34000 - 40000
<i>Whitania</i>	550 - 1000
<i>PAO teorico (1% e.i.e nella pasta)</i>	170-200

Per verificare se l'attività antiossidante degli estratti idro-enzimatici non veniva influenzata dai processi di produzione e di cottura della pasta, ed arrivava quindi intatta al consumatore, si sono svolte misurazione del potere antiossidante di un campione di pasta di semola di grano duro e uno della stessa pasta ma con estratti aggiunti prima della cottura e dopo.

Nelle analisi dei campioni secchi (cioè prima della cottura) e di quelli dopo cottura (campioni di pasta e acqua), si è notato che l'estratto non viene rilasciato nell'acqua di cottura (i valori di potere antiossidante dell'acqua di cottura per la pasta senza e con estratti risultano uguali), si è apprezzata una differenza tra il potere antiossidante della pasta con e senza estratti aggiunti, ma non si è riusciti ad evidenziare in maniera rilevante tale differenza (Figura 3-33). Questo probabilmente è dovuto ad una non completa liberazione, e conseguente determinazione di tutti gli estratti incorporati all'intero della pasta, che provoca la mancata determinazione del potere antiossidante di tutto l'idrolizzato realmente aggiunto.

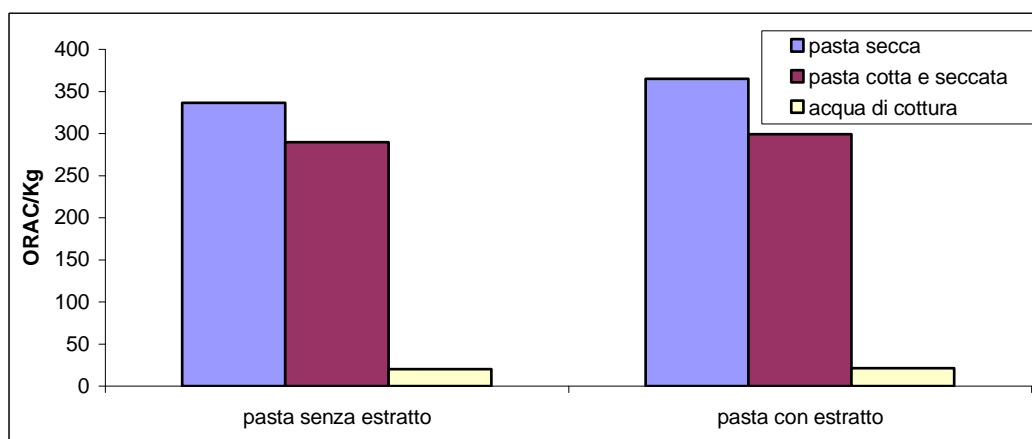


Figura 3-33: Potere antiossidante pasta senza e con e.i.e. aggiunto, prima della cottura (**pasta secca**) e dopo cottura (**pasta cotta e seccata** e **acqua di cottura**)

Anche le successive analisi, dopo prove di estrazione volte a liberare maggiormente l'idrolizzato incorporato nella pasta, non hanno comunque permesso di apprezzare completamente la differenza tra la pasta funzionalizzata e quella no (Figura 3-34).

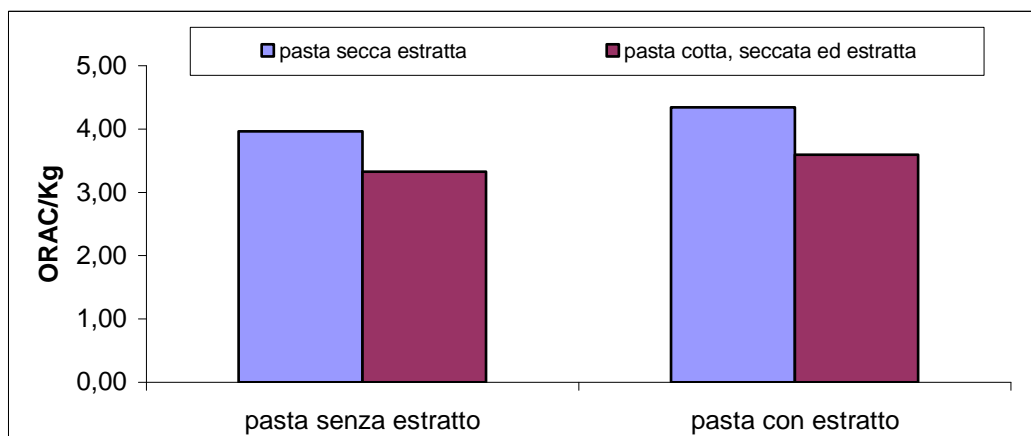


Figura 3-34: Potere antiossidante pasta senza e con estratto dopo processo di estrazione prima della cottura (**pasta secca estratta**) e dopo cottura (**pasta cotta, seccata ed estratta**)

Il modo migliore per liberare maggiormente l'estratto idro-glicerico nella pasta, e quindi ad apprezzare completamente l'attività dell'estratto è stato il trattamento enzimatico della pasta (Figura 3-35).

Dopo tale trattamento si è rilevata una differenza di potere antiossidante tra la pasta con estratto e quella senza pari a 200 ORAC/Kg, perfettamente compreso nel range calcolato teoricamente (Tabella 3-4).

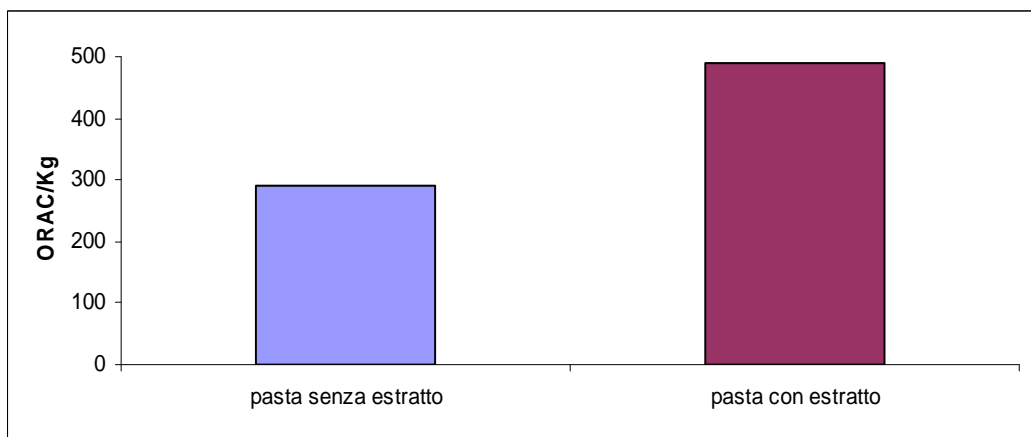


Figura 3-35: Potere antiossidante **pasta senza estratto** e **pasta con estratto** aggiunto dopo trattamento enzimatico

3.5.1.2 Biscotti con e.i.e. di ribes, noce e propoli

Altri prodotti analizzati sono stati dei biscotti contenenti il 2% di un mix di estratti idro-enzimatici di ribes, noce e propoli.

Il ribes è noto per le sue proprietà antiflogistiche e antiallergiche. Inoltre, essendo ricco di antocanosidi e flavonoidi, è un valido antagonista dei radicali liberi.^{75,76}

Il mallo di noce, ricco di juglone, tannini e vitamine, è conosciuto per le sue proprietà antisettiche, antiinfiammatorie, astringenti e depurative, ma il suo impiego non è raccomandabile per uso interno. Le foglie però, contenenti naftochinoni, juglone, tannini, minerali, vitamina C e caroteni, sono di aiuto nelle affezioni quali diabete, obesità, gotta, insufficienze venoso. Nello specifico lo juglone ha proprietà antibatteriche e .funghicide.

La propoli infine, formata da resine e balsami (olio essenziale ricco di terpeni, acido benzoico, cinnamico, caffeico, ferulico, cumarico e loro esteri), cera (caratterizzata da acidi grassi, aminoacidi, in particolare arginina e prolina), vitamine, flavonoidi (galangina flavonoide caratterizzante), polline e minerali, è stato invece dimostrato universalmente, in vivo e in vitro, avere proprietà batteriostatiche⁷⁷. Recentemente si sono effettuati studi sulle proprietà antiinfiammatorie di propoli, fenetil estere dell'acido caffeico (uno dei principi attivi contenuti nella propoli) e galangina (il maggior costituente della propoli e l'attuale riferimento per la titolazione) nei quali si è evidenziato un'azione antinfiammatoria maggiore per la propoli con più alto contenuto di derivato dell'acido caffeico⁷⁸ e si è sottolineata la ormai comprovata attività antiossidante della propoli che risulta maggiorata in presenza di una più alta concentrazione di tale derivato⁷⁹. La propoli oltre alle suddette proprietà ha anche attività antivirale⁸⁰ e cicatrizzante⁸¹.

Per questo tipo di prodotto è importante valutare se l'estratto idro-enzimatico mantiene intatta la sua attività rimanendo attivo e nella forma non ossidata anche in seguito al processo di cottura ad alte temperature in forno a cui è sottoposto durante la preparazione.

Dopo la determinazione del potere antiossidante dei singoli estratti idro-enzimatici (Tabella 3-5) si è effettuata l'analisi del potere antiossidante su un campione di biscotti secco e macinato con il 2% di e.i.e. e senza estratto aggiunto.

Tabella 3-5: Potere antiossidante e.i.e. di ribes, noce e propoli e PAO dei biscotti calcolato teoricamente sapendo che è stato aggiunto il 2% di mix dei tre e.i.e. di ribes, noce e propoli

	ORAC/Kg
<i>Ribes</i>	30750 - 69800
<i>Noce</i>	20000 – 38000
<i>Propoli</i>	65000
<i>PAO teorico</i> <i>(2% e.i.e nei biscotti)</i>	700 - 1100

La differenza in termini di potere antiossidante tra i biscotti contenenti gli estratti idro-enzimatici e quelli senza è risultata essere pari a circa 826 ORAC/Kg (Figura 3-36), valore concorde col valore calcolato teoricamente sulla base dei poteri antiossidanti dei singoli estratti (Tabella 3-5).

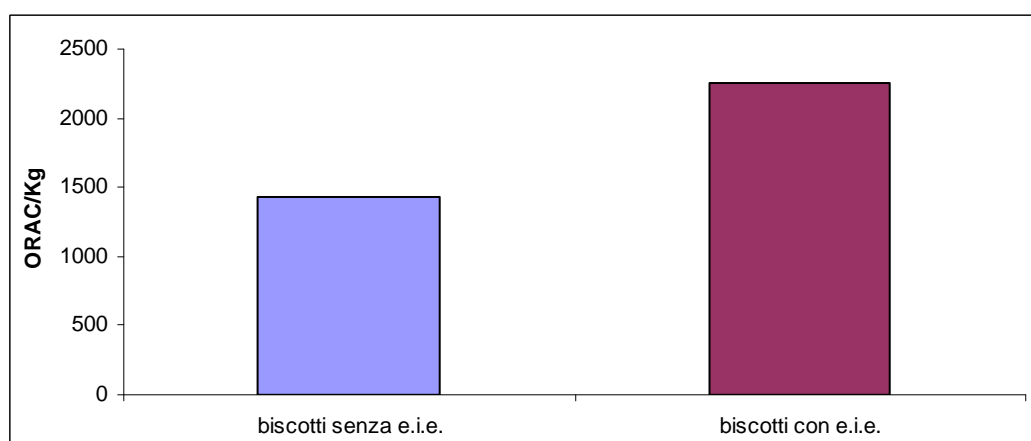


Figura 3-36: Potere antiossidante biscotti

3.5.1.3 Pane azzimo con e.i.e. di noce e astragalo

Altro prodotto analizzato, sempre funzionalizzato con estratti idro-enzimatici, in questo caso noce e astragalo al 2%, è stato un pane azzimo.

Anche in questo caso, come per i biscotti, importante è valutare se, durante la preparazione, il processo di cottura ad alte temperature in forno altera l'estratto idro-enzimatico.

L'astragalo, grazie alla presenza di alcaloidi indolizidinici, saponine, isoflavonoidici e polisaccaridi ha azione immunostimolante, epatoprotettiva e antiradicalica.^{82 83}

L'analisi viene fatta su un campione di pane azzimo secco macinato analizzato nel suo valore di potere antiossidante. Come per i biscotti e la pasta la procedura

viene ripetuta per entrambe le tipologie di campioni: pane azzimo senza estratto e pane azzimo col 2% di estratto.

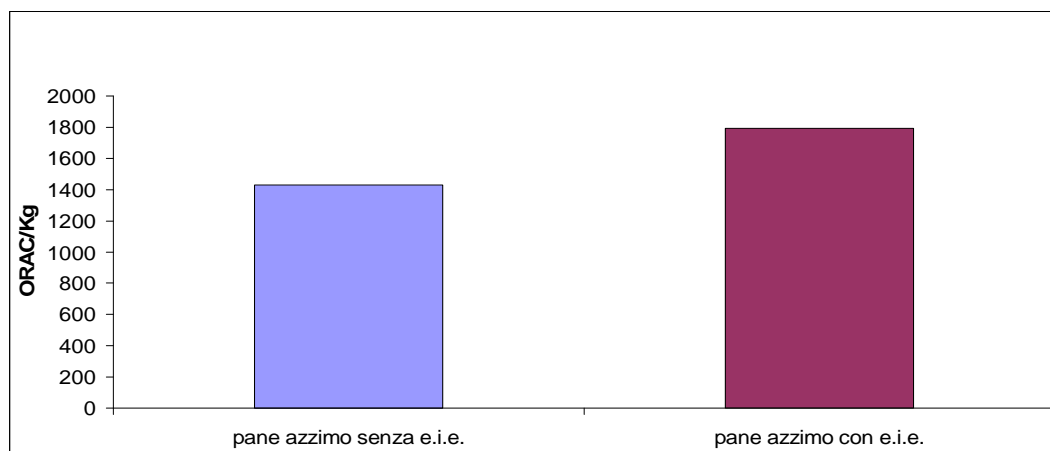


Figura 3-37: Potere antiossidante pane azzimo

Anche in questo caso il metodo impiegato ci ha consentito di rilevare una differenza di valori di potere antiossidante tra pane azzimo tal quale e pane azzimo con estratti e.i.e di noce e astragalo pari a 363 ORAC/Kg (Figura 3-37). Valore che, anche in questo caso, risulta essere in linea con il valore calcolato teoricamente dal potere antiossidante degli estratti idro-enzimatici tal quali (Tabella 3-6).

Tabella 3-6: Potere antiossidante e.i.e. di noce e astragalo e PAO del pane azzimo calcolato teoricamente sapendo che è stato aggiunto il 2% di e.i.e. di noce e astragalo

	ORAC/Kg
<i>Noce</i>	20000 – 38000
<i>Astragalo</i>	2250
<i>PAO teorico</i> <i>(2% e.i.e nel pane azzimo)</i>	210 - 400

4 CONCLUSIONI

Si è dimostrato come determinati bio-liquefatti, prodotti a partire da piante o anche da scarti dell'industria agro-alimentare attraverso specifiche tecniche enzimatiche che permettono l'estrazione dei polifenoli contenuti in esse, possano essere utilizzati come ingredienti in vari prodotti alimentari per conferire determinate funzionalità agli stessi mantenendo o addirittura rinforzando le loro funzionalità durante il processo di produzione.

Analisi svolte su un pane fortificato di idrolizzato di crusca di grano hanno messo in luce l'aumento del potere antiossidante del prodotto finale fino al 200% rispetto ai valori teorici. Tale aumento si è dimostrato non riconducibile ai singoli ingredienti, ma all'azione del lievito in presenza dell'idrolizzato, come dimostrato tramite test di fermentazione. Tali prove hanno mostrato che durante il processo di panificazione avviene un processo di biotrasformazione in grado di convertire l'acido ferulico in un composto dalla capacità antiossidante molto più elevata. Analisi preliminari suggeriscono che tale prodotto possa essere il 4-idrossi-3-metossistirene (2-metossi-4-vinilfenolo), un noto agente aromatizzante che potrebbe conferire ulteriore valore aggiunto all'utilizzo di idrolizzati contenenti acido ferulico nei processi di panificazione, conferendo oltre alla funzionalità antiossidante un miglioramento delle proprietà organolettiche.

Per quanto riguarda gli altri bio-liquefatti utilizzati, si è visto che, introdotti in svariati alimenti, pane, pasta, formaggio, gelato mantengono le loro funzionalità anche dopo i vari processi per l'ottenimento dei prodotti finiti.

Si è inoltre studiato il comportamento in termini di capacità antiossidante di una miscela di idrolizzato di oliva e uva si è visto un comportamento sinergico dei due pool fenolici molto rilevante soprattutto quando i due idrolizzati sono al 50% nella miscela: in questo caso si riscontra infatti un aumento dell'attività radicalica del 32%. L'utilizzo di tale mix di oliva e uva ha portato a risultati molto interessanti per la modulazione del colesterolo: dopo 30 giorni di trattamento con questo mix infatti si è valutata una riduzione media del colesterolo "cattivo" (LDL) pari al 6%, mentre quello buono (HDL) è aumentato di circa il 10,6% e soprattutto il rapporto IRC tra colesterolo totale e colesterolo buono è diminuito dell'11,3%.

Si è dimostrata inoltre la possibilità dell'utilizzo di tale mix di idrolizzato non solo in forma acquosa ma anche in forma solida in quanto il processo di liofilizzazione non va ad alterare le caratteristiche in termini di potere antiossidante del mix. Questo risultato è interessante nell'ottica dell'utilizzo di tali idrolizzati anche in alimenti che non prevedono l'aggiunta di acqua o per andare a funzionalizzare svariati tipi di farine per l'ottenimento di diversi prodotti.

Anche i risultati ottenuti sul gelato in cui l'idrolizzato di oliva aggiunto non va ad alterare né le caratteristiche visive né quelle organolettiche del prodotto finito sono interessanti nell'ottica di introdurre tale idrolizzato in basi per gelato per la produzione di diversi gusti sia per le sue caratteristiche "benefiche" sia come sostituto di altri grassi normalmente utilizzati nei gelati.

Infine, anche per quanto riguarda la funzionalizzazione attraverso estratti idro-enzimatici di quelle matrici in cui è necessario non apportare significativi volumi di acqua ma neppure di solido in polvere si è dimostrato che i metodi di preparazione dei vari prodotti da forno in cui sono stati utilizzati tali estratti (pasta, biscotti e pane azzimo) non vanno ad alterare le loro funzionalità, infatti il loro contributo è evidente in tutti i prodotti finiti in cui sono stati aggiunti.

5 MATERIALI E METODI

5.1 Preparazione e trattamento pane

Il pane su cui sono state eseguite le prove è stato preparato con una comune macchina del pane (“ALICE” della ditta DPE elettrodomestici) attraverso un programma base costituito da utilizzato prevede 3 fasi (impasto, lievitazione e normale cottura) e con i seguenti ingredienti:

- 410 g di farina di grano duro “0”;
- 235 g di acqua di rete;
- 5 g di lievito di birra commerciale liofilizzato per pane e pizza;
- 5 g di zucchero.

Una volta finita la cottura, la pagnotta (Figura 3-1) è stata raffreddata e pesata. Si è poi tagliata una fetta e si è posta in stufa a 50° fino ad essiccamento per determinarne il contenuto in umidità.

Il pane così essiccato è stato macinato, tramite un macina caffè, sino ad ottenere una polvere fine ed omogenea. 10 g di tale polvere sono stati poi estratti attraverso 100 ml di una miscela di acetone/acqua 60:40 (miscela scelta dopo diverse prove svolte in una tesi precedente⁵⁷) lasciata sotto costante agitazione orbitale per 24 ore.

Trascorso tale periodo, i campioni sono stati filtrati su carta (filtri Whatman) e il filtrato ottenuto è stato concentrato sotto vuoto al rotavapor previa determinazione del peso di estratto ottenuto. A fine concentrazione si è determinato, sempre per pesata, l’estratto residuo, poi utilizzato per le analisi successive.

5.2 Determinazione della quantità di polifenoli totali con il metodo del Folin Ciocalteu⁸⁴

Si preparano 5 soluzioni di catechina (Sigma), utilizzata come polifenolo di riferimento, in metanolo a concentrazioni comprese tra 20 e 300 mg/l. In matracci da 20 ml, ad 1 ml di ciascuna soluzione, sono aggiunti: 1 ml di metanolo, 5 ml d’acqua, 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu e, dopo 5 minuti, 4 ml di carbonato di calcio 10% w/v. Si porta a volume con acqua distillata e si legge l’assorbanza a

700 nm dopo 90 minuti d'incubazione a 30°C. La concentrazione di polifenoli in soluzione è calcolata tramite la seguente retta di taratura (Figura 5-1).

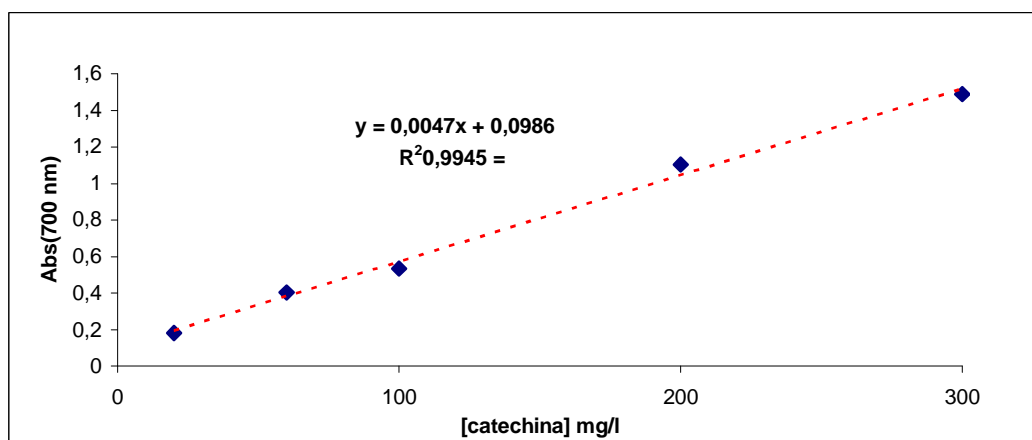


Figura 5-1: Retta di taratura per la determinazione dei polifenoli totali a 30°C.

Da questa retta di taratura, la concentrazione dei polifenoli totali presente nel campione in esame si calcola attraverso la seguente formula:

$$[\text{Polifenoli}] \text{ (mg/l)} = (\text{Abs}_{700 \text{ nm}} - 0,0986)/0,0047$$

Per l'analisi sui campioni, al fine di eliminare sostanze organiche che possono interferire nella lettura, si effettua un passaggio in cartuccia C-18 end-capped, Phenomenex-Strata, 1.0g/ 6ml, secondo il metodo descritto di seguito: si lava la cartuccia con 2 ml di metanolo e si condiziona con 5 ml di acido solforico 0,01 N. Si adsorbe 1 ml di campione, opportunamente diluito in acido solforico 0,1 N, e si aggiungono 2 ml d'acido solforico 0,01 N. Si collega la cartuccia ad un matraccio da 20 ml e si eluisce con 2 ml di metanolo e 5 ml d'acqua distillata. Al contenuto del matraccio si aggiunge 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu e, dopo 4 minuti, 4 ml di carbonato di calcio 10 % p/V portando poi a volume con acqua. Dopo 90 minuti si legge l'assorbanza a 700 nm, avendo cura di centrifugare il campione per allontanare il precipitato di carbonato che si forma, contro un bianco preparato in un matraccio da 20 ml contenente tutti i reagenti e 2 ml di metanolo, ma non contenente fenoli.

5.3 Determinazione del potere antiossidante totale (metodo del DPPH)

Per la determinazione del potere antiossidante 1,5 mL di DPPH (0,1 mM in metanolo) vengono inseriti in provetta e aggiunti di 0,5 mL di campione

opportunamente diluito. Il controllo è costituito da 1,5 mL di DPPH (0,1 mM in metanolo) e 0,5 mL di acqua distillata. Il bianco è costituito da 1,5 mL di metanolo e 0,5 mL di H₂O distillata. Preparati i campioni in provette, queste, vanno tappate immediatamente (al fine di limitare l'evaporazione del solvente), agitate vigorosamente per pochi secondi e poste in un ambiente buio per un tempo di reazione di 60 min.

Infine si eseguono letture allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 517 nm.

5.4 Determinazione del contenuto di carboidrati totali (Metodo fenolo/solforico)

La procedura si basa sul metodo fenolo/solforico^{85,86} che è stata ricavata da una metodica di analisi dei carboidrati totali attraverso analisi spettrofotometrica.

Il metodo è quindi basato su di una retta di taratura costruita con soluzioni standard di D(+)-glucosio alle concentrazioni comprese tra 0,01-0,1 mg/ml.

A 200 µL di standard, posti in un tubo di reazione, si aggiungono 200 µL di soluzione acquosa di fenolo 5%w/v (soluzione stabile nel tempo). Successivamente si aggiunge 1 ml di acido solforico conc. (98%w/w) e rapidamente si chiude il tubo di reazione. Dopo una energica agitazione si lascia sviluppare la reazione per 30 min a 30°C e successivamente si fanno le letture di assorbanza alla lunghezza d'onda di 490 nm contro un bianco costituito da 200 µL di H₂O distillata quindi a concentrazione di zucchero nulla.

Dai valori di concentrazione degli standard e di assorbanza a 490 nm si costruisce la retta di taratura (Figura 5-2, Figura 5-3 e Figura 5-4).

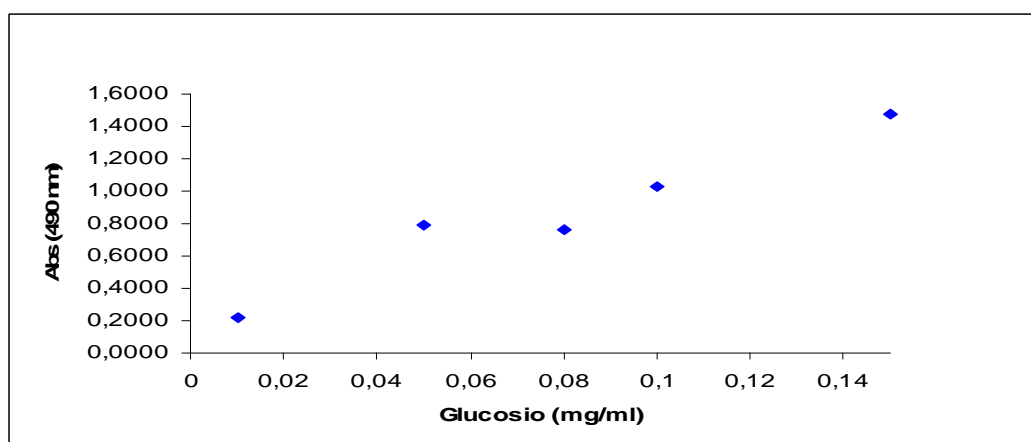


Figura 5-2: Retta di taratura per la determinazione dei carboidrati totali con il metodo fenolo/solforico e operando il raffreddamento a 30°C dei tubi dopo aggiunta di acido solforico conc.

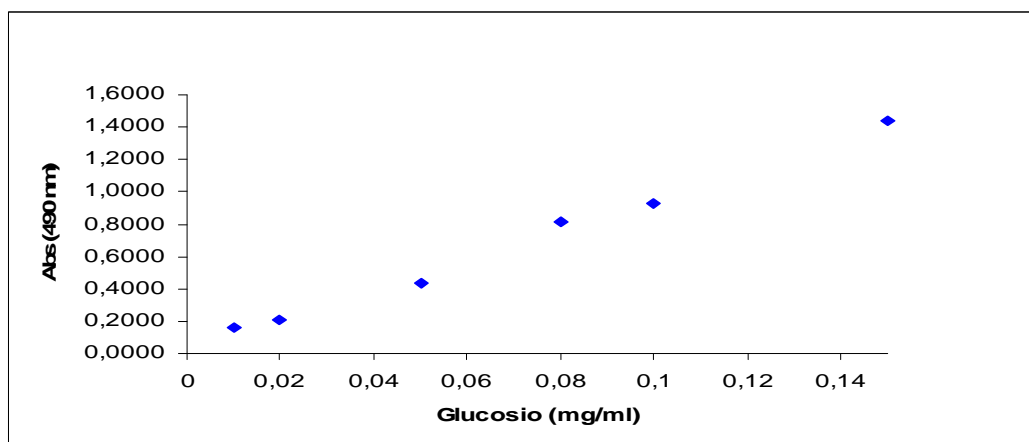


Figura 5-3: Retta di taratura per la determinazione dei carboidrati totali con il metodo fenolo/solforico non operando il raffreddamento dei tubi dopo aggiunta di acido solforico conc.

La retta in Figura 5-2 è stata costruita operando un raffreddamento a 30 °C dei campioni all'interno dei tubi ma come si può osservare tale operazione non garantisce la linearità che si è invece ottenuta effettuando il saggio senza un raffreddamento dei campioni (Figura 5-3).

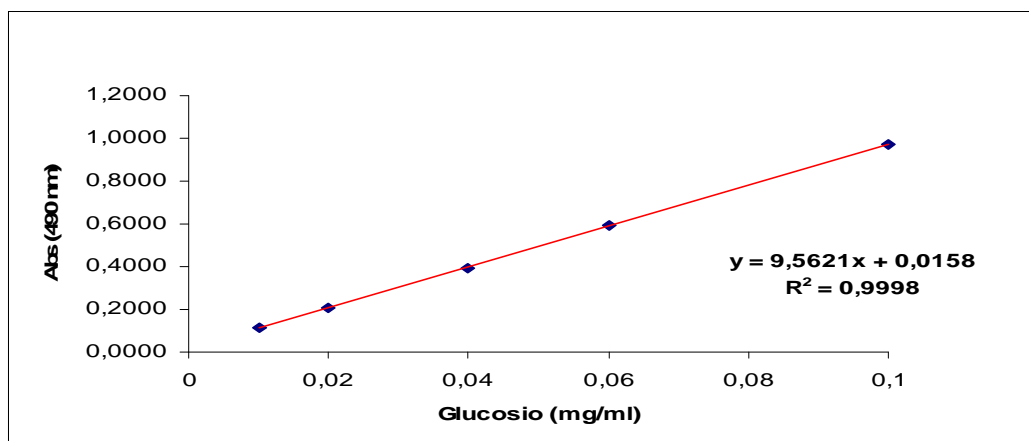


Figura 5-4: Retta di taratura per la determinazione dei carboidrati totali con il metodo fenolo/solforico non operando il raffreddamento dei tubi dopo aggiunta di acido solforico conc.

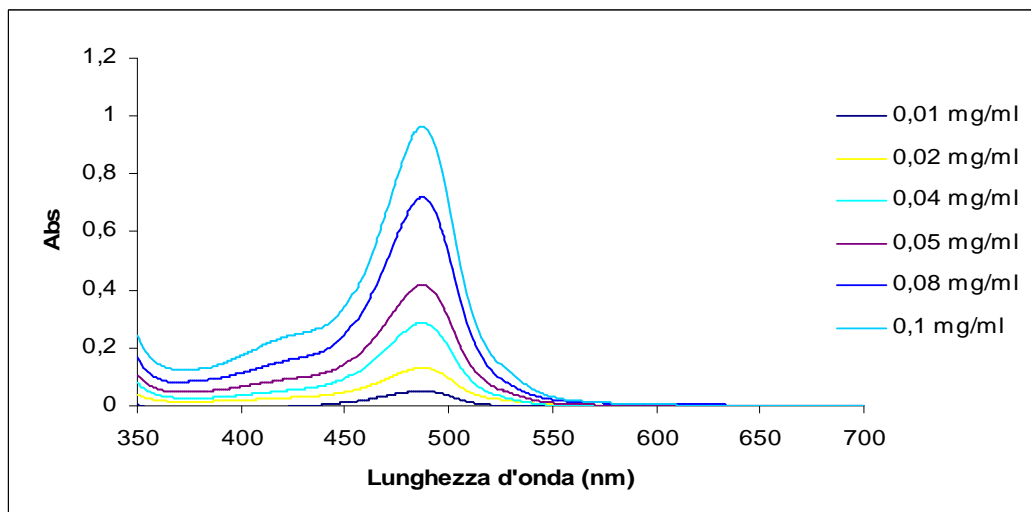


Figura 5-5: Spettri di assorbimento (350-700nm) dei campioni di standard trattati con il metodo fenolo/solforico

Come si può osservare in Figura 5-5 gli spettri di assorbimento dei campioni di standard di glucosio dopo il saggio fenolo/solforico hanno un massimo di assorbimento a lunghezze d'onda di 490 nm e inoltre si ha una proporzionalità diretta tra assorbanza e concentrazione di glucosio e ciò è in linea con i risultati ricercati in letteratura⁸⁷.

La retta di taratura di Figura 5-4, relativa agli spettri di Figura 5-5, verrà utilizzata per le determinazioni sui campioni reali di estratto di fibra di frumento. Un'aliquota di estratto viene centrifugata e il surnatante, opportunamente diluito per ottenere concentrazioni pari a quelle della retta di taratura, viene sottoposto al saggio nelle quantità di 200 μ l. Attraverso il saggio si hanno valori relativi alla quantità di carboidrati totali espressi come concentrazione di glucosio proveniente dall'idrolisi delle catene polisaccaridiche.

5.5 Determinazione degli zuccheri riducenti (Metodo dell'ADNS)

La procedura è basata sul metodo di Bailey *et al.* 1992⁸⁸ e consente la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti liberati tramite reazione ossidativa con acido 3,5-dinitrosalicilico (ADNS)⁽¹⁾. La reazione che

⁽¹⁾ 75g di sodio potassio tartrato vengono sciolti in 50 ml di NaOH 2M, portando a volume di circa 100 ml di acqua distillata. A questa soluzione si aggiungono 0,25 g di Acido Dinitrosalicilico (la dissoluzione di ADNS è lenta ma non bisogna riscaldare, e nemmeno ricorrere al bagno ultrasuoni). Quando ADNS è perfettamente sciolto si porta a volume fino a 250 ml con H₂O distillata e si conserva a 4°C e al riparo dalla luce.

avviene tra il reattivo ADNS e uno zucchero alla base del metodo è riportata in Figura 5-6.

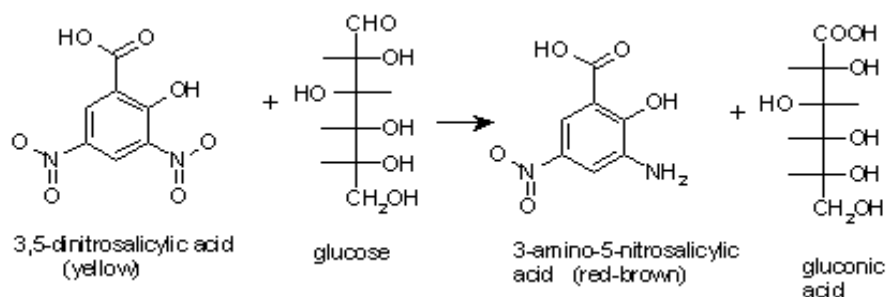


Figura 5-6: Reazione ossidoriduttiva fra glucosio e acido 3,5-dinitrosalicilico (giallo) con formazione di acido gluconico e acido 3-ammino-5-nitrosalicilico (rosso)

Per determinare la concentrazione degli zuccheri riducenti di interesse presenti nei campioni si utilizza la retta di taratura preparata a partire da soluzioni di D(+) glucosio riportata in Figura 5-7.

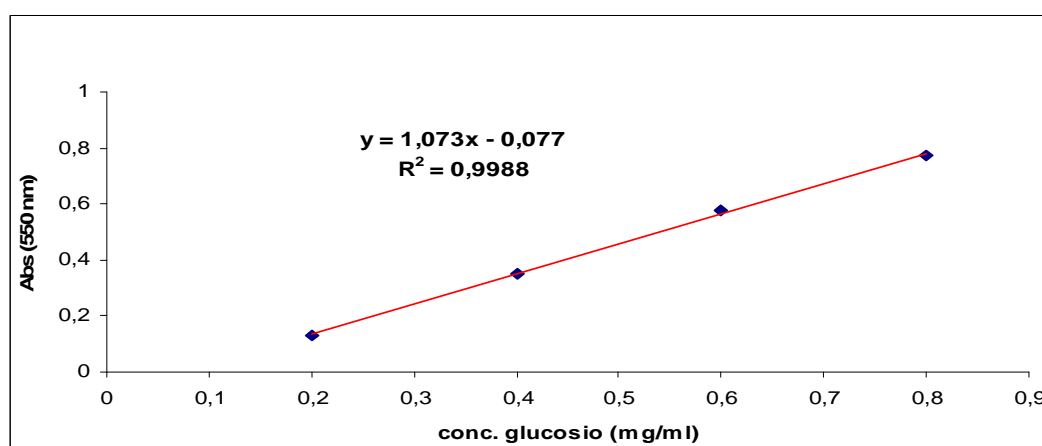


Figura 5-7: Retta di taratura per la determinazione dell'attività xilanasi

$$\text{Glucosio rilasciato [mg/ml]} = (\text{Abs}_{550\text{nm}} + 0,077) / 1,073$$

Per la determinazione degli zuccheri riducenti nei campioni si aggiungono a 400 µl di campione 600 µl di ADNS e si pone il tutto in acqua bollente per 7 minuti. Dopo raffreddamento e centrifugazione (13000 rpm per 5 min) si esegue la lettura spettrofotometrica a 550 nm contro un bianco preparato una soluzione di 1,8 ml di substrato e 0,2 ml di acqua distillata e da questa soluzione 400 µl vengono prelevati e aggiunti a 600 µl di ADNS.

5.6 Determinazione dei pentosani (Metodo con floroglucinolo)

La procedura utilizzata si basa su un metodo colorimetrico rapido e riproducibile con floroglucinolo come reattivo per la determinazione dei pentosani nelle farine di frumento⁸⁹.

Come tutti i saggi nella messa a punto si fanno prima delle prove preliminari per constatare la fattibilità e la riproducibilità del metodo impiegato, poi successivamente si passa alla costruzione di una retta di taratura con un substarto di riferimento che nel nostro caso è D(+)-xilosio.

Si preparano quindi soluzioni acquose di D(+)-xilosio alle concentrazioni comprese tra 0,025 e 0,5 mg/ml . In un tubo di reazione (nel nostro caso si è scelto una capsula eppendorf) a un aliquota di standard di 0,2 ml si aggiunge 1 ml di reattivo fresco preparato al momento. Il reattivo è costituito dai seguenti composti:

- 11 ml di acido acetico glaciale;
- 0,2 ml di acido cloridrico conc. 37%
- 0,5 ml di soluzione di floroglucinolo 20% w/v in etanolo
- 0,1 ml di soluzione di D(+)-glucosio 1,75% w/v in acqua.

I tubi di reazione, una volta chiusi e agitati, vengono messi in bagno di acqua a 100°C per 25 min . Allo scadere del tempo si raffreddano rapidamente i campioni e si effettuano le letture di assorbanza a due lunghezze d'onda, rispettivamente 510 e 552 nm, contro un bianco costituito da 0,2 ml di H₂O distillata e 1 ml di reattivo.

Il campione con il bianco è leggermente giallina mentre quelli con gli standard assumono una colorazione viola- rosso/arancio.

La curva di taratura si costruisce riportando il valore della differenza tra assorbanza letta a 552 nm e a 510 nm in funzione della concentrazione corrispondente e si ottiene la retta riportata in Figura 5-8.

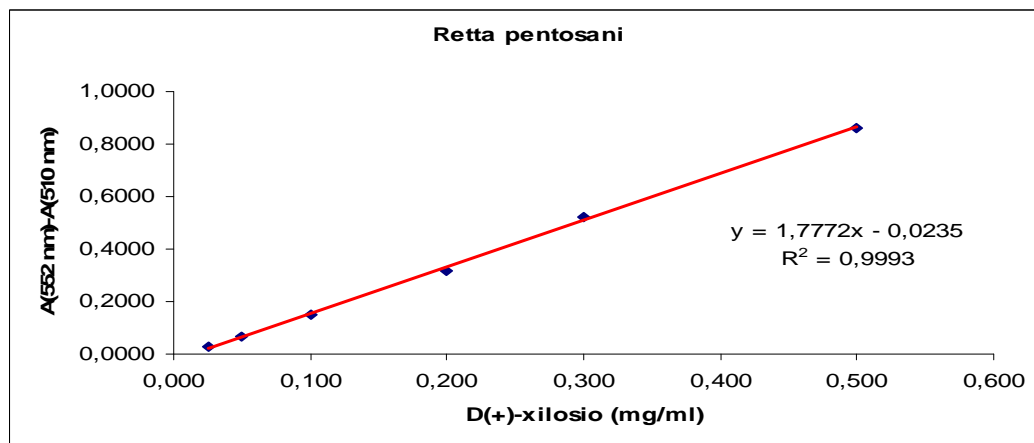


Figura 5-8: Retta di taratura per la determinazione dei pentosani con il metodo che utilizza il reattivo floroglucinolo

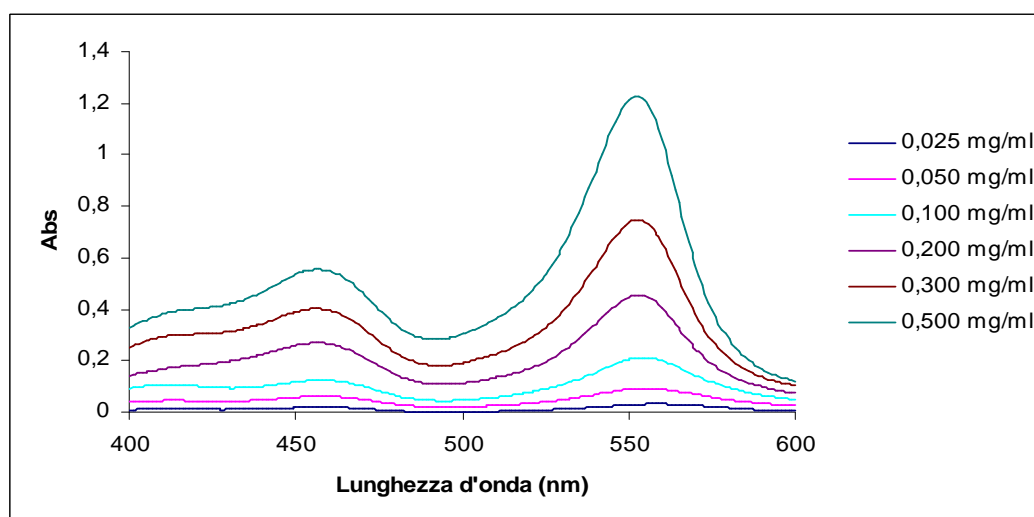


Figura 5-9: Spettri di assorbimento (400-600nm) dei campioni di standard trattati con il metodo che utilizza il reattivo floroglucinolo

In Figura 5-9 sono riportati gli spettri di assorbimento dei campioni e come si può osservare si ha un massimo a 552 nm e un minimo a circa 510 nm. La retta di taratura si costruisce quindi con un valore di differenza di assorbenza e non un valore diretto.

5.7 Determinazione del contenuto in acido ferulico tramite HPLC

È stata preparata una soluzione madre di acido ferulico a 1000 ppm, utilizzando come solvente metanolo per HPLC con uno 0,5% di acido acetico glaciale. La soluzione è stata poi opportunamente diluita nello stesso solvente in modo da

ottenere soluzioni contenenti concentrazioni di acido ferulico pari a 2,5-5-10-15-20 ppm.

Le soluzioni così ottenute sono state sottoposte ad analisi HPLC, con detector UV-Vis alla lunghezza d'onda di 280 nm.

Il volume di campione iniettato è di 20 µl, le fasi mobili, la colonna utilizzata ed il metodo HPLC utilizzato vengono descritti di seguito:

- fase Mobile A: acqua per HPLC con uno 0,5% di acido acetico glaciale e un 2% di acetonitrile per HPLC;
- fase Mobile B: acetonitrile per HPLC con uno 0,5% di acido acetico glaciale;
- colonna: Luna 5u Phenyl-Hexyl 150x3.0 mm 5.00±0.30 µm (PHENOMENEX);
- velocità di flusso: 1ml/min.

Il gradiente utilizzato è riportato in Tabella 5-1, il tempo complessivo di analisi è di 25 minuti più 5 minuti per il ricondizionamento della colonna.

Tabella 5-1: Gradiente utilizzato per l'analisi HPLC

STEP	% FASE A	% FASE B	TEMPO (min)
0	96	4	/
1	96	4	10
2	70	30	20
3	0	100	25
4	96	4	30

Per ogni soluzione di acido ferulico è stato registrato il corrispondente cromatogramma dal quale si è potuta determinare l'area del picco ed il tempo di ritenzione dell'acido (21 minuti circa), in modo da poter costruire una retta che mettesse in relazione area del picco del ferulico con la concentrazione corrispondente.

In questo modo si è ottenuta la retta di taratura riportata in Figura 5-10.

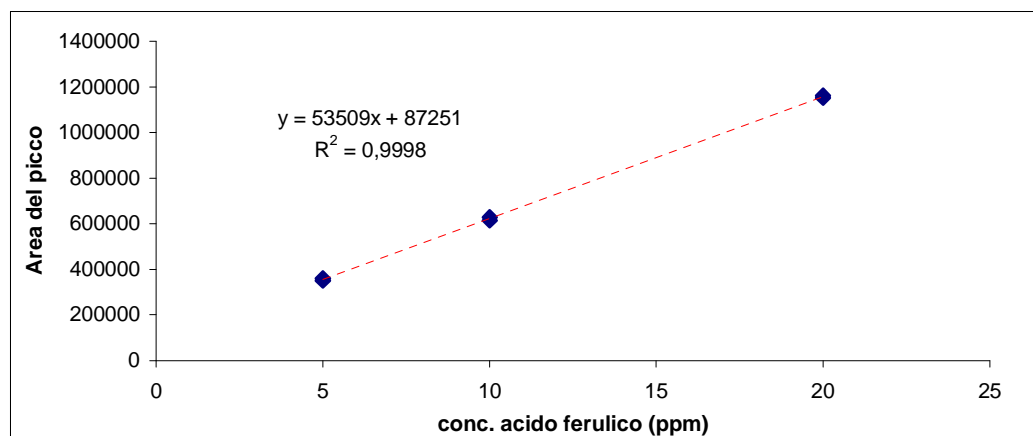


Figura 5-10: Retta di taratura dell'acido ferulico

Per la determinazione dell'acido ferulico in campioni reali, si diluisce opportunamente il campione in metanolo per HPLC con uno 0,5% di acido acetico glaciale. I campioni diluiti vengono filtrati su filtri di carta tipo Whatmann n.1, ed iniettati seguendo la procedura precedentemente descritta.

5.8 Preparazione campione di pasta all'uovo

5.8.1 Cottura, estrazione e analisi

La pasta all'uovo senza e con idrolizzato d'oliva aggiunto, è stata analizzata tal quale (cioè cruda) dopo essiccazione in stufa a 40-50 °C e macinazione; e anche dopo cottura. Per fare ciò si è simulata una normale cottura della pasta e si sono cotti 10 g di pasta in 80 ml di acqua bollente con aggiunta di 0,1 g di sale. La pasta è stata cotta 5 minuti (fino a cottura), scolata e sull'acqua di cottura tal quale sono state eseguite le analisi per la determinazione del potere antiossidante, mentre la pasta cotta è stata seccata in stufa, macinata ed analizzata.

Dopo questa prima analisi, per migliorare la disaggregazione della matrice alimentare e quindi per aumentare il rilascio dei polifenoli dell'idrolizzato aggiunto alla pasta e quindi presenti all'interno di essa, dopo la cottura la pasta è stata frullata e si è eseguito un trattamento enzimatico (simile a quello utilizzato da Phenbiox per la produzione dei bio-liquefatti). Per cui, sia sulla pasta senza e con idrolizzato aggiunto, si è andati ad aggiungere un mix di enzimi che si sono lasciati agire tutta la notte e dopo tale trattamento si è determinato il potere antiossidante della pasta.

5.9 Estratti idro-enzimatici (e.i.e.)

5.9.1 Preparazione estratti idro-enzimatici

Gli estratti idro-enzimatici vengono preparati facendo bollire la pianta di interesse in acqua bollente e, dopo l'attuazione del trattamento enzimatico in acqua brevettato da Phenbiox per sfibrare il vegetale e renderlo in parte solubile in acqua si esegue un'aggiunta di glicerina (di origine vegetale) per massimizzare l'estrazione e, dopo filtrazione, si ottiene l'estratto glicerico idro-enzimatico che può essere utilizzato tal quale o introdotto in vari preparati.

5.9.2 Preparazione campione di pasta di semola di grano duro

5.9.2.1 Campioni di pasta secca e cotta

Le analisi effettuate sono state eseguite su un campione di pasta di semola di grano duro senza estratti idro-enzimatici aggiunti e uno di pasta di semola di grano duro con l'1% di un mix di e.i.e. di tiglio e withania.

Le analisi sono state condotte su un campione (per ogni tipologia di pasta – senza e con e.i.e.) secco, cioè tal quale, prima della cottura, solamente macinato e uno dopo cottura. Per la cottura si è simulata una normale cottura con 10 g di pasta in 80 ml di acqua bollente con 0,1 g di sale. La pasta è stata fatta cuocere circa 15 minuti (fino a cottura). La pasta cotta, prima dell'analisi, viene separata dall'acqua di cottura (analizzata poi tal quale), essiccata in stufa a 30-40 °C e, una volta macinata si analizza nel suo valore di potere antiossidante.

5.9.2.2 Prove di estrazione della pasta secca e cotta

Per cercare di estrarre maggiormente l'estratto dalla matrice e verificare meglio il mantenimento della sua attività anche nel prodotto finito, sia sul prodotto secco prima della cottura che su la pasta dopo cottura e seccatura della stessa, si è eseguito un processo di estrazione con una miscela estraente acetone/acqua 60:40 messa a punto e usata precedentemente per le analisi sul pane (paragrafo 5.1) consistente nel lasciare per 24 ore 10 g di pasta macinata in 100 ml della miscela estraente sotto agitazione orbitale. Trascorso tale periodo, i campioni vengono filtrati su carta (filtri Whatman) e il filtrato ottenuto concentrato sotto vuoto al rotavapor previa determinazione del peso di estratto ottenuto. A fine

concentrazione si determina, sempre per pesata, l'estratto residuo, poi utilizzato per le analisi successive.

5.9.2.3 *Trattamento enzimatico della pasta cotta*

Per cercare di disgregare maggiormente la matrice di pasta si è eseguito un trattamento enzimatico (simile a quello utilizzato da Phenbiox per la produzione dei bio-liquefatti). Per cui, sia sulla pasta senza e con idrolizzato aggiunto, si è andati ad aggiungere un mix di enzimi che si sono lasciati agire tutta la notte e dopo tale trattamento si è determinato il potere antiossidante della pasta.

5.9.3 *Preparazione campione biscotti e pane azzimo*

Le analisi su queste due matrici è stata effettuata sui campioni, senza e con estratto aggiunto, semplicemente macinati, in quanto, a differenza della pasta essi non subiscono nessun processo di cottura prima dell'utilizzo e probabilmente, per il diverso modo di preparazione ottenimento del prodotto finale, la disgregazione della matrice risulta soddisfacente anche con la semplice macinazione.

6 BIBLIOGRAFIA

¹ <http://www.unesco.org/culture/ich/en/RL/00394>.

² Tecnologie alimentari, Gennaio/Febbraio **2007**.

³ *Complex Carbohydrates in foods*, British Nutrition Foundation **1990**.

⁴ National Research Council, **1989**.

⁵ Diet, *nutrition and the prevention of chronic diseases*. Report of a EHO study group, WHO Technical Reports **1990**.

⁶ Visioli F., Caruso D., Galli C., Viappiani S., Sala A., *Olive Oils rich in natural Catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans*, Biochemical and Biophysical Research Communications, **2000**, 278, 797-799.

⁷ Coate, D., *Moderate drinking and coronary heart disease mortality: Evidence from NHANES I and NHANES II follow-up*, American Journal of Public Health, **1993**, 83, 888-890.

⁸ Marmot M., Brunner E., *Alcohol and cardiovascular disease: the status of the U shaped curve*, Br Med J., **1991**; 303, 565-568.

⁹ Fridman G.D., Klatsky A.L., New England Journal of Medicine., **1993**, 329, 1881-1883.

¹⁰ Singleton V. L., in Proceedings of University of California, Davis, Grapes Wine Centennial Symposium, **1982**, 215-227.

¹¹ Chi-Tang Ho, *Phenolic Compounds in food and their effects on health II*, Am. Chem. Soc., Washington, **1992**, 2-7.

¹² Milaneschi Y., Bandinelli S. Corsi A. M., Lauretani F., Paolisso G. et al., *Mediterranean diet and mobility decline in older persons*, Experimental Gerontology, **2011**, 46, 303-308.

¹³ Maxwell S., Cruickshank A., Thorpe G., *Red wine and antioxidant activity un serum*, Lancet, **1994**, 344, 193-194.

- ¹⁴ Moroney M.A., Alcaraz M.J., Forder T.A. et al., *Selectivity of Neutrophil 5-Lipoxygenase and Cyclo-oxygenase Inhibition by an Anti-inflammatory Flavonoid Glycoside and Related Aglycone Flavonoids*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, **1988**, 40, 787-792.
- ¹⁵ Ragaei, S, Abdel-Aal, EM, Noaman, *Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use* FOOD, **2006**, 98, 32-38.
- ¹⁶ Oszamianski 1988; Lecham et al., 1991; Ashraf et al., **1994** Rozes and Peres, **1998**; Scalbert and Williamson, **2000**.
- ¹⁷ Åman P., Newman C.W. *Chemical composition of some different types of barley grown in Montana, U.S.A.* J. Cereal Sci., **1986**, 4, 133-141.
- ¹⁸ J Klepacka, L Fornal *Ferulic Acid and its position among the phenolic compounds of wheat*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **2006**, 46, 639-647.
- ¹⁹ Grassi G., Bridwater A.V., *Biomass for Energy and environmental, agriculture and industry in Europe - A strategy for the future*. Commission of the European Communities **1990**.
- ²⁰ Di Blasi C., Tanzi V. e Lanzetta M., *A study for the production of agricultural residues in Italy*. Biomass and Bioenergy, **1997**, 12, 321-331.
- ²¹ Atti di Conferenza “*Le biomasse, le potenzialità di recupero e valorizzazione*” Rimini, 21 Maggio **2007**.
- ²² Dati ISTAT www.istat.it.
- ²³ Ventura B., Vodret A., Farris G.A., *Valorizzazione della crusca ai fini tecnologici e nutrizionali*, Tecnica molitoria, **1998**.
- ²⁴ Benamrouche S., Crônier D., Debeire P., Chabbert B., *A chemical and histological study on the effect of (1→4)-β-xylanase treatment on wheat bran*, Journal of Cereal Science, **2002**, 36, 253-260.
- ²⁵ Ventura B., Vodret A., Farris G.A., *Valorizzazione della crusca ai fini tecnologici e nutrizionali*, Tecnica molitoria, **1998**.

-
- ²⁶ Craig B. Faulds, Begona Bartolomé , Gary Williamson, *Novel biotransformations of agro-industrial cereal waste by ferulic acid esterases*, Industrial Crops and Products, **1996**, 6, 367-374.
- ²⁷ Liangli (Lucy) Yu, Kequan Zhou, John W Parry, *Inhibitory effects of wheat bran extracts on human LDL oxidation and free radicals*, LWT, , **2005**, 38, 463–470.
- ²⁸ Wen A., Delaquis P., Stanich K., Toivonen P., *Antilisterial activity of selected phenolic acids*, Food Microbiology, **2003**, 20, 305–311.
- ²⁹ Saija A., Tomaino .A., Trombetta D., De Pasquale A., Uccella N., Barbuzzi T., Paolino D., Bonina F., *In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents*, International Journal of Pharmaceutics, 199, 39–47.
- ³⁰ Sakai S., Ochiai H., Nakajima K., Terasawa K., *Inhibitory effect of ferulic acid on macrophage inflammatory protein-2 production in a murine macrophage cell line raw264.7*, CYTOKINE, **1997**, 9, 242-248.
- ³¹ Suzuki A., Kagawa D., Fujii A., Ochiai R., Tokimitsu I., Saito I., *Short- and Long-Term Effects of Ferulic Acid on Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats*, AJH, **2002**, 15, 351–357.
- ³² Yong-Zhong Hou, Jie Yang, Guang-Rong Zhao, Ying-Jin Yuan, *Ferulic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation induced by angiotensin II*, European Journal of Pharmacology, **2004**, 499, 85– 90
- ³³ Zhaohui Zhang, Taotao Wei, Jingwu Hou, Gengshan Lia, Shaozu Yu, Wenjuan Xin, *Iron-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: attenuation by tetramethylpyrazine and ferulic acid*, European Journal of Pharmacology, **2003**, 467, 41–47.
- ³⁴ Rossi L., Piccinini S., Soldano M., Labartino N., *Recupero e valorizzazione energetica (biogas) e di materia(fertilizzanti e mangimi)degli scarti organici di origine agro-industriali: indagine quali-quantitativa*. Atti di seminario Ecomondo **2006**.
- ³⁵ Caputo A. C., Scacchia F., Pelagagge M. , *Disposal of by-products in olive oil industry: waste to Energy solution*, Applied Thermal Engineering, **2003**, 23, 197-214.
- ³⁶ Ciafardini G., Zullo B.A., *Nuove soluzioni per il recupero delle acque di vegetazione delle olive* L'informatore Agrario, **2005**, 28, 47-49.

- ³⁷ Petruccioli M, Servili M, Montedoro GF, Federici F *Development of a recycle procedure for the utilization of vegetation waters in the olive oil extraction process*, - *Biotechn. let.* **1988**, 10, 55-60.
- ³⁸ Amat P., Rinaldi A., Sanjust E., Satt G., Viola, A. Vegetable material in water in the olive oil industry: raw material or polluting waste. *Riv. Merceol.* **1984**. 25, 183-199.
- ³⁹ L:R. N. *Usi economicamente sostenibili degli scarti e dei sottoprodotti della lavorazione delle olive* *Informatore Agrario* **37/99**.
- ⁴⁰ Visioli F., Caruso D., Galli C., Viappiani S., Galli G., Sala A., *Olive Oils Rich in Natural Catecholic Phenols Decrease Biochemical and Biophysical Research Communications Isoprostane Excretion in Humans*, **2000**, 278, 797-799.
- ⁴¹ Visioli F., Galli C., *Biological Properties of Olive Oil Phytochemicals* University of Milan, Department of Pharmacological Sciences, Milan, Italy **2007**.
- ⁴² Bernini R., Mincione E., Bartonini M., *Hydroxytyrol and its lipophilic derivatives: useful antioxidants for cosmetic, nutraceutical and dietetic applications*, *Seminary Ecomondo Rimini*, **2006**, 101-106.
- ⁴³ Tsimidou et al., *Food Chemistry*, **1992**, 44, 53.
- ⁴⁴ *Office International de la vigne et du vin*.
- ⁴⁵ Dati APAT: www.apat.gov.
- ⁴⁶ Dati Camera di Commercio Regione Emilia-Romagna: www.cameradicommercioemilia-romagna.it
- ⁴⁷ Bossini A., Di Guardo A. e Mannini M., *Industrie agrarie*, **1993**, 224.
- ⁴⁸ Scincalepore V., *Industrie agrarie olearie, enologiche, lattiero-casearia*. Unione tipografica torinese, Torino, **1998**, 234.
- ⁴⁹ Ribereau-Gayon, Glories Y., *I composti fenolici dell'uva e del vino*, Institut d'Oenologie-Faculté des Science de l'Université di Bordeaux, 148.
- ⁵⁰ Fuleki T. e da Silvia J.M.R., *J Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 2211-2216.

-
- ⁵¹ L. Poquet, M.N. Clifford and Gary Williamson *Transport and metabolism of Ferulic Acid through the Colonic Epithelium*. Drug Metabolism and Disposition **2008** 190-197.
- ⁵² Elena Ansaloni e Dario Zanichelli *Recupero e valorizzazione energetica (biogas) e di materie (fertilizzanti e mangimi) degli scarti organici dell'industria di trasformazione delle produzioni vegetali e animali Recupero di biofenoli da scarti dell'agroindustria Progetto Laboratorio Regionale LITCAR* **2008**.
- ⁵³ M B. Katan, N M. Roos, *Promises and Problems of Functional Foods*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition , **2004**, 44, 369-377.
- ⁵⁴ European consensus on developing health claims legislation on functional foods, **1999**.
- ⁵⁵ Ioannis S. Arvanitoyannis Maria Van Houwelingen-Koukaliarglou *Functional Foods: A Survey of Health Claims, Pros and Cons, and Current Legislation* Critical Rieviews in Food Science and Nutrition, **2005**, 45, 385-404.
- ⁵⁶ Setti L., Zanichelli D., Filippini A., Carloni F., *Metodo per il trattamento di matrici vegetali*, Italian Patent: BO2007A000542 / *Method for the treatment of vegetal matter* WO2009016482.
- ⁵⁷ Agnieszka Iwanska, *La valorizzazione di sottoprodotti agro-alimentari tramite lo sviluppo di alimenti fortificati, Relazione finale in Corso Integrato di Biochimica Industriale e Fermentazioni*, A. A. 2008-2009.
- ⁵⁸ Tiwari U., Cummins E., *Meta-analysis of the effect of B-glucan intake on blood cholesterol and glucose levels*, Nutrition, **2011**, 27, 1008-1016.
- ⁵⁹ Lim H. J., Choi Y.-M., Choue R., *Dietary intervention with emphasis on folate intake reduces serum lipids but not plasma homocysteine levels in hyperlipidemic patients*, Nutrition Research, **2008**, 28, 767-774.
- ⁶⁰ Revilla E., Santa Maria C. Miramontes E. et al., *Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of water-soluble enzymatic extract from rice bran*, Food Research International, 2009, 42, 387-393.
- ⁶¹ Huang Z., Dosta L. e Rosazza J.P., *Microbial transformations of ferulic acid by Saccharomyces cerevisiae and Pseudomonas fluorescens*, Applied and Enviromental Microbiology, July **1993**, 59, 2244-2250.

⁶² Fukai S., Tanimoto S., Maeda A., Fukuda H., Okada Y. E Nomura M., *Pharmacological activity of compounds entracte from Persimmon Peel (diospiro kaki THUNB.)*, Journal of Oleo Science **2009**, 58, 213-219.

⁶³ Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

⁶⁴ *Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), “anti-inflammatory properties” (ID 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract” (3779), and “contributes to body defences against external agents” (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006*, EFSA Journal, **2011**, 9, 2033.

⁶⁵ Davidson M. H., Abate N., Ballantyne C. M., Catapano A. L., Xu X., Lin J., Rosenberg E., Tershakovec A. M., *Ezetimibe/simvastatin compared with atorvastatin or rosuvastatin in lowering to specified levels both LDL-C and each off ive other emerging risk factors for coronary heart disease: Non-HDL-cholesterol, TC/HDL-C, apolipoprotein B, apo-B/apo-A-I, or C-reactive protein*, Journal of Clinical Lipidology, **2008**, 2, 436-446.

⁶⁶ Castilla P., Echarri R., Dávalos A., Cerrato F., Ortega H., Teruel J. L. Lucas M. F. Coronado D. G., Ortuno J. e Lasunciòn M. A., *Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects*, American Journal of Clinical Nutrition, **2006**, 84, 252-262.

⁶⁷ Covas M. I., Nyysoonene K., Poulsen H. E., Kaikkonen J., Zunft H. J. F., Kiesewetter H., Gaddi A. et al., *The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors – A randomized trial*, Annals of Internal Medicine, **2006**, 145, 33-341.

⁶⁸ McPhersons R., Frohlich J., Fodor G. , Genest J., *Canadian Cardiovascular Society position statement - Recommendations fort he diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease*, Can J Cardiol, **2006**, 22, 913-927.

⁶⁹ Visioli F., Galli C., Bornet F., Mattei A., Patelli R., Galli G., Caruso D., *Olive oil phenolics are dose dependently absorbed in humans*, FEBS Letters, **2000**, 468, 159-160

⁷⁰ Salvini S., Sera F., Caruso D., Giovannelli L., Visioli F., Saieva C., Masala G., Ceroti M., Giovacchini V., Pitozzi V., Galli C., Romani A., Mulinacci N., Bortolomeazzi R., Dolara P. e Palli D., *Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces*

oxidative DNA damage in postmenopausal women, British Journal of Nutrition, **2006**, 95, 742-751.

⁷¹ Bruneton J., *Pharmacologie phytochimie plantes medicinales*, Ed. Lavoisier, Paris, **1993**.

⁷² Viola H. et al., *Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from Tilia tomentosa (Tiliaceae)*, J. Ethnopharmacol. **1994**, 44, 47-53.

⁷³ Duke JA, CRC Handbook of Med. Herbs **1987**, 514-515.

⁷⁴ Battacharya SK et al, Phytotherap Res **1987**, 1, 32.

⁷⁵ Alcaraz M.J. et Jimenez M.J., *Flavonoids as anti-inflammatory agents*, Fitoterapia, **1988**, 59, 25-38.

⁷⁶ Kahkonene M.P. et al., *Berry phenolics and their antioxidant activity*, J. Agric. Food Chem. **2001**, 49, 4076-4082.

⁷⁷ Sibel Silici , Osman Kaftanoglu . Antimicrobial Analysis of propolis sample from different regionin Turkey , *Uludag Bee Journal August* **2003**.

⁷⁸ F. Borrelli, P. Maffia, L. Pinto, A. Ianaro, A. Russo, F. Capasso, A. Ialenti . *Phytochemical compounds involved in the antiinflammatory effect of propolis extract* , Fitoterapia, **2002**, 73 Suppl. 1 S53–S63.

⁷⁹ A. Russo, R. Longo, A. Vanella, *Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin*, Fitoterapia ,**2002**, 73 Suppl. 1 S21–S29.

⁸⁰ A. Kujumgiev , I. Tsvetkova , Yu. Serkedjieva , V. Bankova , R. Christov , S. Popov . *Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin* , Journal of Ethnopharmacology, **1999**, 64, 235–240.

⁸¹ Stefano Castaldo, Francesco Capasso, *Propolis, an old remedy used in modern medicine*, Fitoterapia, **2002**, 73 Suppl. 1, S1–S6.

⁸² Zhang W.J. et al., *Antiinflammatory activity of astragaloside IV is mediated by inhibition of NF-kappaB activation and adhesion molecule expression*, Thromb Haemost, **2003**, 90, 904-14.

-
- ⁸³ Li X. Et al., *A novel antioxidant agent, astragalosides, prevents shock wave-induced renal oxidative injury in rabbits*, Urol Res. **2006**.
- ⁸⁴ Folín & Ciocalteu , *On tyrosine and triptophan determination in protein*, V°1927, Journal of biological chemistry , 73,627-650.
- ⁸⁵ Chaplin M.F., Kennedy J.F., *Colorimetric assay*, Carbohydrate analysis , **1986**
- ⁸⁶ Mecozzi M., Acquistucci R., Amici M, Cardilli D., *Improvement of an ultrasound assisted method for the analysis of total carbohydrate in environmental and food samples*, Ultrasonics Sonochemistry **2002**, Vo. 9, pp. 219-223.
- ⁸⁷ Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*, Division of Biochemistry, University of Minnesota.
- ⁸⁸ Bailey M.J., Biely P., Poutanen K., *Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity*, Journal of Biotechnology, **1992**, 23, 257-270.
- ⁸⁹ Douglas S. G., *A rapid method for the determination for determination of pentosans in wheat flour*, Food Chemistry, **1981**, 7, 139.145.